



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

**INFLUENCIA DE LOS FACTORES GENÉTICOS
EN LA HEPATOTOXICIDAD SECUNDARIA A
FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS**

Tesis Doctoral

Virginia Leiro Fernández

2008



ALBERTO FERNÁNDEZ VILLAR, Doctor en Medicina y Facultativo Especialista en Neumología del Hospital Xeral-Cíes del Complexo Hospitalario Universitario de Vigo, DIANA VALVERDE PÉREZ, Doctora en Biología y Profesora contratada del Departamento de Bioquímica, Genética y Biología de la Universidad de Vigo, y ARTURO GONZÁLEZ QUINTELA, Doctor en Medicina y Profesor Titular de Universidad del Departamento de Medicina de Santiago de Compostela, como directores.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Influencia de los factores genéticos en la hepatotoxicidad secundaria a fármacos antituberculosos” ha sido realizada bajo nuestra dirección por Dña. VIRGINIA LEIRO FERNÁNDEZ, Licenciada en Medicina, en el Hospital Xeral-Cíes del Complexo Hospitalario Universitario de Vigo. Estimado que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al Grado de Doctor, solicitan que sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Santiago de Compostela, 31 de Julio de 2008

Alberto Fernández Villar

Diana Valverde Pérez

Arturo González Quintela

A mi hijo, a Fernando y a toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a los Doctores Alberto Fernández Villar, Diana Valverde Pérez y Arturo González Quintela haber aceptado la dirección de esta tesis, y su confianza, esfuerzo y dedicación.

A todos los pacientes que aceptaron participar en este estudio, por su altruismo y confianza en la investigación médica.

Al Doctor Rafael Vázquez Gallardo y, a Nieves, Ana y María, de la Unidad de Tuberculosis de Vigo, por su colaboración, por su motivación en la investigación y su buen hacer.

Al Doctor Luis Anibarro y a Alberto de la Unidad de Tuberculosis de Pontevedra por su amable colaboración.

A los Doctores Daniel Díaz Cabanela de la Unidad de Tuberculosis de A Coruña, y a la Doctora Adela Acuña de la Unidad De Tuberculosis de Orense por su desinteresada colaboración.

Al Doctor Enrique Caso por su confianza en mi capacidad para la realización de esta tesis, su optimismo, sus facilidades y consejos y, sobre todo, su apoyo a mi labor investigadora.

A las Doctoras Maribel Botana y Cristina Represas, por su amistad y por el ánimo, apoyo y ayuda que en todo momento me han dado.

A Lucía Constenla por su gran esfuerzo, dedicación, profesionalidad, alegría y ganas de aprender, pero sobre todo, por su amistad.

Al Doctor Maximiliano Álvarez por sus consejos y experiencia aportada en el Laboratorio de Investigación.

A la Doctora Marily Andrade por su colaboración y apoyo continuo.

A Mabe de la Fundación por su alegría, capacidad resolutive y ayuda.

A Rafa de Suministros por su simpatía, su preocupación y colaboración.

A la Doctora Mar Mosteiro por la formación recibida durante la residencia, y por haber despertado en mí la capacidad de crítica científica.

A los Doctores Luis Piñeiro y Juan Carlos Barros, y a los demás componentes del Servicio de Neumología del Complejo Hospitalario Universitario Xeral-Cíes de Vigo por las enseñanzas recibidas, su profesionalidad y su apoyo a mi labor investigadora.

A los Doctores Javier de la Fuente y César Martínez Vázquez por contagiarme su afán investigador.

A Fernando y a mi hijo, por su paciencia, comprensión, apoyo incondicional, consejos, y por todo el sacrificio que supone el tiempo robado de su compañía.

A mis padres, por el ejemplo que me han dado, su comprensión y su esfuerzo.

A mis hermanos y a toda mi familia por su apoyo y entendimiento.

A mis amigas por estar siempre ahí.

“Seguramente lo que mejor diferencia al ser humano del resto de los seres vivos, es su capacidad de elaborar una hipótesis, y una vez elaborada, someterla a la crítica, tanto propia como ajena, en busca de la verdad”

Karl Raimund Popper 1983.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS	3
I.2. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS	6
I.3. HEPATOTOXICIDAD SECUNDARIA A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS	19
I.3.1. GENERALIDADES	19
I.3.1.1. INCIDENCIA	20
I.3.1.2. PATOGENIA	21
I.3.1.3. PATRONES DE LESIÓN	22
I.3.1.4. MEDICIÓN DE LAS ENZIMAS HEPÁTICAS	24
I.3.1.5. MONITORIZACIÓN ANALÍTICA	24
I.3.1.6. SÍNDROMES CLÍNICOS DE HEPATOTOXICIDAD SECUNDARIA A DROGAS	25
I.3.2. HEPATOTOXICIDAD DURANTE EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE	28
I.3.2.1. PAUTAS CON ISONIACIDA EN MONOTERAPIA	28
A. INCIDENCIA	28
B. PATOGENIA	30
C. FACTORES DE RIESGO	34
I.3.2.2. PAUTAS CON RIFAMPICINA EN MONOTERAPIA	39
A. INCIDENCIA	39
B. PATOGENIA	40

C. FACTORES DE RIESGO	41
I.3.2.3. REGIMENES COMBINADOS	41
A. PAUTAS CON ISONIACIDA Y RIFAMPICINA	42
B. PAUTAS CON RIFAMPICINA Y PIRAZINAMIDA	42
I.3.3. HEPATOTOXICIDAD DURANTE EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA CON ISONIACIDA, RIFAMPICINA Y PIRAZINAMIDA	45
I.3.3.1. INCIDENCIA	45
I.3.3.2. PATOGENIA	46
I.3.3.3. FACTORES DE RIESGO	47
I.3.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO Y MANEJO TERAPEÚTICO	51
I.4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS: GENERALIDADES	60
I.5. POLIMORFISMOS DEL <i>N-ACETILTRANSFERASA 2</i>	61
I.5.1. INTRODUCCIÓN	61
I.5.2. ENZIMAS <i>N-ACETILTRANSFERASA</i>	62
I.5.3. GENOTIPO ACETILADOR	64
I.5.4. RELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO	68
I.5.5. VARIACIONES INTERÉTNICAS DEL POLIMORFISMO ACETILADOR	70
I.5.6. ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO <i>NAT2</i> CON DIFERENTES PATOLOGÍAS	71
I.5.7. POLIMORFISMO <i>NAT2</i> Y RIESGO DE HEPATOTOXICIDAD SECUNDARIA A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS	74
I.6. POLIMORFISMOS DE LA <i>GLUTATION S-TRANSFERASA</i>	78

I.6.1. INTRODUCCIÓN	78
I.6.1.1. <i>GSTM1</i>	79
I.6.1.2. <i>GSTT1</i>	80
I.6.2. FUNCIÓN ENZIMÁTICA	81
I.6.3. FRECUENCIAS DE LAS DELECCIONES <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i>	
EN LAS DIFERENTES POBLACIONES	84
I.6.4. SUSTANCIAS METABOLIZADAS POR <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i>	87
I.6.5. POLIMORFISMOS NULOS <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i> Y RIESGO DE	
HEPATOTOXICIDAD POR FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS	88
I.6.6. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS NULOS <i>GSTM1</i> Y	
<i>GSTT1</i> CON DIFERENTES PATOLOGÍAS	89
I.7. POLIMORFISMOS DEL <i>CYP2E1</i>	95
I.7.1. INTRODUCCIÓN	95
I.7.2. POLIMORFISMOS DEL <i>CYP2E1</i>	97
I.7.3. DIFERENCIAS INTERÉTNICAS	100
I.7.4. FUNCIÓN ENZIMÁTICA DEL <i>CYP2E1</i>	101
I.7.5. <i>CYP2E1</i> Y RIESGO DE TOXICIDAD	103
I.7.5.1. ANESTÉSICOS	104
I.7.5.2. PARACETAMOL	105
I.7.5.3. ALCOHOL	105
I.7.5.4. FÁRMACOS ANTIUBERCULOSOS	107
I.7.6. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS <i>CYP2E1</i> CON	
OTRAS PATOLOGÍAS	109

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	113
II.1. OBJETIVO GENERAL	115
II.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	116
 III. METODOLOGÍA	 117
III.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	119
III.2. SELECCIÓN DE LOS SUJETOS A ESTUDIO	119
III.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	120
III.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	120
III.3. VARIABLES A ESTUDIO	121
III.4. ESTUDIO GENÉTICO DE LOS POLIMORFISMOS	122
III.4.1. TOMA DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ADN	122
III.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA	124
III.4.2.1. PCR GEN <i>NAT2</i>	124
III.4.2.2. PCR GENES <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i>	126
III.4.2.3. PCR GEN <i>CYP2E1</i>	128
III.4.3. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	129
III.4.3.1. DIGESTIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DEL GEN <i>NAT2</i>	130
III.4.3.1. DIGESTIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DEL GEN <i>CYP2E1</i>	134
III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	136
III.6. CRONOGRAMA DEL ESTUDIO	137

IV. RESULTADOS	139
IV.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO	141
IV.2. POLIMORFISMOS DEL GEN <i>NAT2</i>	144
IV.3. POLIMORFISMOS DEL GEN <i>GST</i> : <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i>	147
IV.4. POLIMORFISMOS DEL GEN <i>CYP2E1</i>	149
IV.5. RIESGO DE HEPATOTOXICIDAD ASOCIADO A LA PRESENCIA DE VARIOS POLIMORFISMOS	150
V. DISCUSIÓN	151
V.1. POLIMORFISMOS DEL GEN <i>NAT2</i>	156
V.2. POLIMORFISMOS DEL GEN <i>GST</i>	168
V.3. POLIMORFISMOS DEL GEN <i>CYP2E1</i>	170
V.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	173
V.4.1. DERIVADAS DEL DISEÑO	173
V.4.2. DERIVADAS DEL ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS	174
VI. CONCLUSIONES	177
VII. BIBLIOGRAFÍA	181
VIII. ADDENDA	221

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADH	Aldehído deshidrogenasa
ADVP	Adictos a drogas por vía parenteral
ALT	Alanina transaminasa
AST	Aspartato transaminasa
ATS	American Thoracic Society
Anti-VHC	Anticuerpos del virus de la hepatitis C
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHOP	Complejo Hospitalario de Pontevedra
CHUVI	Complejo Hospitalario Universitario de Vigo
CIM	Concentración mínima inhibitoria
CIOMS	Council of International Organizations of Medical Sciences
CYP	Citocromo P-450
DE	Desviación estándar
DXSP	Dirección Xeral de Saúde Pública
E	Etambutol
EDO	Lista de enfermedades de declaración obligatoria
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FA	Fosfatasa alcalina
FAT	Fármacos antituberculosos
GGT	Gammaglutamil transpeptidasa
GI	Gastrointestinal
GSEC	Genetic Susceptibility to Enviromental Carcinogens
GST	Glutation S-transferasa
H	Isoniacida
HBsAg	Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
HBeAg	Antígeno E del virus de la hepatitis B
HFAT	Hepatotoxicidad secundaria a fármacos antituberculosos
HLA	Alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad
HSD	Hepatotoxicidad secundaria a drogas
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%
IDSA	Infectious Disease Society of America
Im	Intramuscular

IMC	Índice de masa corporal
L	Litro
LSN	Límite superior de la normalidad
LES	Lupus eritematoso sistémico
M	Marcador
MAH	Monoacetilhidracina
min	Minutos
MR	Multirresistencia
MnSOD	Manganeso superóxido reductasa
NAT	N-acetiltransferasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PXN	Receptores pregnane X
R	Rifampicina
RFLP	Restriction fragment lenght polymorphisms
RIQ	Rango intercuantil
S	Estreptomicina
seg	Segundos
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
TB	Tuberculosis
TITL	Tratamiento de la infección tuberculosa latente
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UI	Unidades Internacionales
UICTER	Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
UTB	Unidad de control y prevención de la tuberculosis
VHB	Virus hepatitis B
VHC	Virus hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Z	Pirazinamida

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. SITUACIÓN ACTÚAL DE LA TUBERCULOSIS.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa, conocida desde la antigüedad, causada por especies del género *Mycobacterium*. Dentro de este género las especies que más afectan al hombre son las agrupadas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*), si bien el agente etiológico habitual es el *M. tuberculosis*.

A pesar de disponer en la actualidad de tratamientos adecuados para curarla, los datos epidemiológicos reflejan una situación muy lejana de conseguir su erradicación mundial. Cada año casi dos millones de personas fallecen a causa de la TB en el mundo, a pesar de que se dispone de tratamientos baratos que son eficaces hasta en el 95% de los casos (1).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre el 2000 y el 2020 cerca de mil millones de personas contraerán la infección, doscientos millones de personas enfermarán y ésta cobrará como mínimo 35 millones de vidas (2). La pandemia de TB tiene un reparto muy desigual, afectando predominantemente a zonas con escasos recursos socioeconómicos y a las clases sociales más desprotegidas. Aunque las tasas de TB por 100.000 habitantes han ido disminuyendo en países industrializados, en España esta enfermedad sigue presentando un problema de salud importante con una tasa en el año 2000 de 19,64/100.000 habitantes, según datos procedentes del sistema EDO (lista de enfermedades de declaración obligatoria), existiendo grandes diferencias entre las comunidades autónomas (3).

Galicia es una de las comunidades más afectadas, aunque la evolución de esta enfermedad está siendo muy favorable. Según datos del Registro

Gallego de Tuberculosis ha descendido el número de casos de 2.030 en 1996 a 1.050 en 2005, lo que supone pasar de 72,3 a 37,6 casos por 100.000 habitantes, siendo la disminución por término medio anual del 7,1% (4,5). La buena evolución en global puede ser atribuida a varios factores como la mejora de los tratamientos, el descenso del número de casos de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y los esfuerzos realizados por las comunidades autónomas a través de los distintos Programas de Prevención y Control de la Tuberculosis (6). Con respecto a este último aspecto cabe resaltar el éxito del Programa Gallego de Prevención y Control de la Tuberculosis, que promueve la realización de la captación y seguimiento activo de los casos a través de siete Unidades de Control y Prevención de la TB (UTB), situadas en los complejos hospitalarios de las ciudades de A Coruña, Santiago, Ferrol, Lugo, Ourense, Pontevedra y Vigo (5).

Con respecto al resto de Europa, aunque nuestras tasas de TB no son tan elevadas como la de los países del centro y del este, somos el segundo país que presenta la tasa más elevada de Europa occidental, después de Portugal (7).

La TB incide con mayor frecuencia en personas de niveles socioeconómicos débiles y especialmente si presentan algún factor de riesgo asociado: diabetes, insuficiencia renal crónica, silicosis, neoplasias, desnutrición, gastrectomía, o el tratamiento esteroideo prolongado (6). La denominación de “Grupos de Riesgo Especial” hace referencia a aquellos colectivos y situaciones específicas en las que la TB se presenta con una incidencia significativamente mayor que en la población general, su clínica es diferente, y su manejo deberá ser distinto del estándar previamente

establecido. Dentro de éstos merece la pena señalar varias situaciones: a) la TB en el infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y en el inmigrante por su grave impacto numérico, su repercusión en el ámbito de la salud pública y en la eficacia de los Programas de Control de Tuberculosis, b) la TB que se presenta en estados de inmunodepresión inducidos yatrogénicamente, por ejemplo el transplante o, más recientemente, con el uso de los inhibidores del factor de necrosis tumoral (anti-TNF- α), c) la TB en situaciones en las que se produce un cúmulo de factores de riesgo como ocurre en las instituciones penitenciarias [comunidad cerrada con un porcentaje significativo del VIH, adicción a las drogas por vía parenteral (ADVP), inmigración, alcoholismo y nivel socioeconómico bajo] (6).

Actualmente la infección por el VIH es el principal factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad. El porcentaje de infección VIH/TB, así como la incidencia de SIDA han bajado en los últimos años debido a las actividades de lucha VIH/SIDA y a la introducción de las terapias antirretrovirales (6). En Galicia, el porcentaje de coinfección TB/VIH siempre se ha mantenido por debajo del 10%, siendo en el último año evaluado del 4,2% (4,5).

En cuanto al aumento del número de inmigrantes procedentes de países con altas tasas de incidencia de TB en Galicia, en el año 2005, 3 de cada 100 enfermos de TB diagnosticada en dicha comunidad no nacieron en el estado español, porcentaje que fue aumentando desde el año 1999 de forma paralela a la tendencia ascendente que se observa en el número de personas inmigrantes en la comunidad (4,5).

También hemos de tener en cuenta los brotes que se siguen presentando en distintas instituciones en las que las condiciones de

hacinamiento favorecen la difusión de la micobacteria (guarderías, colegios y residencias de la tercera edad) (4,5).

Todo ello hace que la TB siga siendo un problema importante de salud pública a nivel mundial, en España, y fundamentalmente en Galicia aunque en los últimos años se hayan ido reduciendo paulatinamente las tasas de incidencia gracias a un mejor grado de control de la misma.

I.2. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS.

La TB tiene un tratamiento eficaz que asegura, en los casos no complicados, una tasa de curación superior al 95%. *Mycobacterium tuberculosis* tiene un tiempo de generación prolongado y la capacidad para entrar en periodos de latencia con una actividad metabólica limitada, lo cual dificulta la acción de los antimicrobianos (8). Los principios fundamentales del tratamiento de la TB son eliminar bacilos tuberculosos rápidamente, prevenir la aparición de resistencias, eliminar bacilos persistentes en diversos tejidos y prevenir recidivas (8). El modelo teórico de tratamiento farmacológico se fundamenta en el conocimiento de la biología del bacilo tuberculoso dentro del huésped y los mecanismos específicos de acción de los fármacos antituberculosos (FAT) (8).

Las micobacterias presentan una resistencia natural a numerosos antibacterianos, debido a que poseen una pared muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos. También se han descrito enzimas modificantes como las betalactamasas o sistemas de eflujo (8). La resistencia bacteriológica se debe a una mutación natural e irreversible, que surge espontáneamente, a partir de un determinado número de bacilos

(10^m) variable según el fármaco. La probabilidad de una doble mutación frente a dos fármacos exige la suma de 2 potenciales (10^{m+n}) y aún la de 3 (10^{m+n+p}) para que pueda existir una mutación para 3 fármacos (9). La aparición de una mutación que condicione una resistencia se inicia a partir de una población de 10^5 bacilos, por lo que un solo fármaco es capaz de eliminar poblaciones bacilares menos numerosas, siendo el fundamento de la monoterapia con Isoniacida en el tratamiento de la infección tuberculosa latente (TITL), en la que sólo aparecen mutantes resistentes a partir de 10^5 bacilos (9). En cambio, en un enfermo con lesiones cavitarias, que tiene una población entre 10^7 y 10^9 bacilos, una monoterapia o su asociación con otros fármacos previamente invalidados (monoterapia encubierta) sólo permiten una destrucción inicial importante, pero con selección de los mutantes resistentes, cuya ulterior multiplicación provoca su reaparición. La repetición de este fenómeno de mutación-selección-multiplicación, durante sucesivas monoterapias reales o encubiertas da lugar a enfermos crónicos multirresistentes (9). En la práctica clínica, resistencia significa que el enfermo no responderá al tratamiento como lo hace el infectado con bacilos sensibles. Bacteriológicamente, expresa que en la población bacilar hay una proporción de mutantes resistentes, igual o superior al 1% (nivel crítico preestablecido), que le permite desarrollarse frente a determinados fármacos en concentraciones superiores a la concentración mínima inhibitoria (CIM). La resistencia puede ser primaria en enfermos que nunca han recibido fármacos antituberculosos (FAT) como consecuencia de una transmisión desde un enfermo con resistencia adquirida o de una mutación anómala natural, secundaria o adquirida debida a tratamientos incorrectos que eliminan la población sensible y permiten la selección-multiplicación de los

mutantes preexistentes e inicial como consecuencia de tratamientos previos no conocidos, ignorados o falseados (9).

Existen poblaciones de bacilos diferentes en función de su localización y actividad, lo que condiciona distintas formas de lograr su eliminación (8,9). Los bacilos presentes en las cavidades pulmonares se multiplican de forma activa en un ambiente aerobio y situación extracelular. Los del interior de los macrófagos lo hacen en un ambiente microaerofílico y ácido que induce la latencia. Los que se encuentran en el interior del *caseum* tienen un crecimiento lento debido a que es un medio desfavorable. Por lo tanto, *M. tuberculosis* puede encontrarse en los tejidos, donde la penetración de los antibióticos es fácil, o en cavidades pulmonares, pus o material caseoso, donde la penetración de los antibióticos resulta más difícil. En estas situaciones los bacilos son persistentes y refractarios a los fármacos, por lo que sólo pueden ser eliminados por las defensas del huésped o tratamiento intervencionista. Finalmente hay que señalar que el pH bajo del material caseoso y el del interior de los macrófagos condiciona la actividad de los distintos fármacos (8,9). Los FAT presentan un perfil de actividad diferente frente a cada una de estas localizaciones por lo que es necesario que el tratamiento sea activo frente a todas ellas.

El éxito del tratamiento de la TB se basa en la asociación de fármacos y en su larga duración (8-10). Se clasifican en dos grupos en función de su eficacia, potencia, efectos tóxicos y tolerabilidad. El primero incluye los llamados FAT de primera línea, que son los utilizados para el tratamiento inicial de la tuberculosis. El segundo lo forman los de segunda línea o de reserva, usados para las formas de TB resistentes a los anteriores o como alternativa en

algunas situaciones clínicas especiales. Los fármacos de primera línea son: isoniácida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) y estreptomycin (S). En la tabla 1 se muestran sus características farmacocinéticas y los efectos secundarios. El grupo de los de segunda línea lo forman la protionamida, cicloserina, capreomicina, clofazimina, fluorquinolonas y algunos macrólidos y rifamicinas (8-10). El esquema de tratamiento idóneo de la enfermedad tuberculosa debería de tener un elevado poder bactericida y esterilizante, bajo número de recidivas, bajo coste y buena aceptación y tolerancia. No existe ningún esquema ideal que cumpla todos estos requisitos.

Tabla 1: Características de los fármacos antituberculosos de primera línea

Fármaco	Vía	Dosis habitual	Dosis habitual	Pico	CIM	Efectos
		adultos (máxima)	niños (máxima)	sérico (g/μl)		adversos más frecuentes
Isoniacida	Oral	5 mg/Kg/día	5-10 mg/Kg/día	4,5-7	0,05-0,2	Hepatitis
		(300 mg/día)	(300 mg/día)			Polineuritis
Rifampicina	Oral	10 mg/Kg/día	10 mg/Kg/día	10	>0,5	Molestias GI
		(600 mg/día)	(600 mg/día)			Hepatitis
Piracinamida	Oral	15-30 mg/Kg/día	15-30 mg/Kg/día	30-50	20	Hiperuricemia
		(2 g/día)	(2 g/día)			Hepatitis
Etambutol	Oral	15-25 mg/Kg/día		2-5	1-5	Neuritis óptica
Estreptomycin	Im	15 mg/Kg/día	20-40 mg/Kg/día	25-50	8	Alteraciones
		(1 g/día)				vestibulares y auditivas

Abreviaturas: Im, intramuscular; GI, gastrointestinal; CIM, concentración mínima inhibitoria.
Adaptada de las referencias 2 y 8.

Los límites de eficacia para cualquier régimen terapéutico, en países con cifras de menos del 5% de resistencia primaria, deben ser superiores al 97% en un seguimiento de 5 años (8-10).

El esquema terapéutico que se ha aceptado como estándar es el de 6 meses de duración que incluye la combinación de H, R y Z durante los 2 primeros meses seguidos de H y R durante 4 meses hasta completar los 6 meses de tratamiento (8-10). Debe de añadirse un cuarto fármaco en aquellas zonas con una incidencia de resistencia primaria a la H superior al 5%, cuando el paciente ha recibido tratamiento previo con antimicobacterianos, cuando procede de un país con elevada incidencia de TB resistente o cuando existe el antecedente de un contacto con un paciente con TB resistente (8-10). Se añadiría el E en adultos y la S en niños debido a la imposibilidad de monitorizar la agudeza visual. En los pacientes con infección por VIH la R y la H debe de mantenerse 9 meses en vez de 6 meses. En aquellos pacientes en los que se confirme la resistencia primaria a la H el tratamiento debe de completarse 10 meses (8-10).

Para el tratamiento de la enfermedad tuberculosa latente (TITL) lo más habitual es emplear regímenes simples con un solo fármaco, generalmente con H durante 6-12 meses (8,11). Otro posible esquema en monoterapia es el uso de R durante 4 meses (8,11). En cuanto a los esquemas terapéuticos combinados se ha utilizado la R más H durante 3 meses siendo aparentemente igual de eficaz y segura que la terapia estándar con H (8,11,12). A pesar de los resultados favorables obtenidos con la combinación de R y Z durante 2 meses en pacientes VIH, dicho régimen se ha asociado a una elevada incidencia de

hepatotoxicidad, incluso mayor a la observada en regímenes con H, R y Z (8,11,12).

A pesar de que se cumplen 50 años desde la introducción de una quimioterapia eficaz contra la TB, el número de casos a escala mundial es mayor y, además, aumenta el número de infecciones por cepas resistentes a FAT. Esta situación pone de manifiesto que, en el manejo de esta enfermedad se cometieron varios errores, algunos atribuibles a los profesionales sanitarios y otros a los propios pacientes, destacando entre ellos la prescripción de tratamientos inadecuados y el incumplimiento terapéutico. El incumplimiento se asocia a varios factores de riesgo como la pobreza, inmigración, infección por el VIH, drogadicción y disminución de los recursos sociales y sanitarios, que explican el aumento no esperado del número de casos y el incremento de los bacilos resistentes (13).

Los escasos estudios sobre multiresistencias publicados hasta 1994 tenían serias limitaciones, con sesgos en las muestras, insuficiente validación de las técnicas de laboratorio, no diferenciación entre resistencias primarias y adquiridas, etc. Por ello en 1994 la OMS y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), pusieron en marcha un Proyecto mundial de vigilancia de resistencias, con uniformidad de criterios, de forma que nos permite comparar estos datos y conocer la importancia real del problema (14). Se han publicado resultados correspondientes al periodo 1994-1999 en el que se incluyó información sobre la resistencia primaria en 54 países o puntos geográficos (14). La prevalencia de la resistencia primaria frente a cualquier fármaco fue del 10,7% y la prevalencia de multirresistencia primaria del 1%. En Galicia la Dirección Xeral de Saúde Pública (DXSP) puso

en marcha en el año 2000 su estudio con el objetivo principal de conocer la situación real de la comunidad (13). Desde el 1 de noviembre de 2000 hasta el 1 de Junio de 2001 se incluyeron 360 pacientes que no habían recibido tratamiento antituberculoso previo y 40 pacientes tratados anteriormente. Se analizó la resistencia a H, R, E y S. La resistencia primaria fue del 11,7% (H, 4,4%; R, 1,4%; E, 2,2%; S, 7,2%) y la secundaria del 22,5% (H, 17,5%; R, 7,5%; E, 7,5%; S, 17,5%) (18). El porcentaje de multirresistencia (MR) en pacientes nunca tratados fue del 1,4%. Estos resultados indican que la comunidad gallega se encuentra en una buena situación en el tema de resistencias. El análisis de resultados de dos estudios más recientes no aporta grandes cambios en la situación de las MR en Galicia (15,16). Varios estudios han demostrado que la resistencia a los FAT se debe a mutaciones espontáneas en los genes que codifican la diana del fármaco o enzimas implicadas en la activación del fármaco (8,17-19). La tasa con la que tienen lugar estas mutaciones varía en función del fármaco, siendo la más elevada la del E y la más baja la de la R y quinolonas. No obstante, no se conoce una alteración genética que, por si misma, de lugar al fenotipo MR (definido como la asociación de resistencias como mínimo a H y R). Este fenotipo MR se debe a la adquisición secuencial de mutaciones en diferentes locus de genes independientes (8,17-19). La detección precoz de la resistencia y los mecanismos de producción son esenciales para el correcto control de la TB resistente y el desarrollo de técnicas moleculares que permitan su detección precoz (8).

A continuación se describen las características, actividad, mecanismos de resistencia y efectos secundarios de los FAT de primera línea.

Isoniacida:

La H es un fármaco sintético cuyo uso terapéutico comenzó en los años 50. Es un fármaco generalmente activo frente a los integrantes del complejo tuberculoso mientras que el papel del mismo en el tratamiento de otras micobacterias es muy limitado (8). La H es un profármaco que requiere una activación in vivo que producirá un potente derivado, con capacidad de oxidar o acilar grupos proteicos, interfiriendo finalmente en la síntesis de los ácidos micólicos de la pared de *M. tuberculosis* (8).

La H es tan solo activa frente a los bacilos en replicación activa, siendo su papel muy limitado en las poblaciones latentes como las del caseum, o en las poblaciones latentes del interior de los macrófagos. Las concentraciones séricas después de 2 horas de una dosis oral de 300 mg son de 4,5 a 7 µg/ml (8-10,20).

Uno de sus efectos secundarios más graves es su capacidad para producir hepatotoxicidad. En la mayor parte de los casos se producen elevaciones asintomáticas de las transaminasas, hecho que puede ocurrir hasta en el 10-15% de los pacientes tratados. El riesgo de hepatitis sintomática es muy bajo (0,1%) antes de los 30 años y se incrementa de manera progresiva hasta el 4% en mayores de 65 años (12). También puede originar polineuritis periférica por déficit de piridoxina (8-10).

La activación de la H se lleva a cabo por el enzima catalasa-peroxidasa codificado por el gen *katG*. Las mutaciones en este gen son las principales responsables de la resistencia de alto nivel a la H (8,17-19). El derivado activo de la H actúa bloqueando la síntesis de los ácidos micólicos. Una de las dianas intracelulares del derivado activo es la reductasa de la proteína transportadora

de los ácidos acilenólicos codificada por el gen *inhA* (8,17-19). En aproximadamente el 25% de las cepas resistentes se producen mutaciones de *inhA* y suelen asociarse a resistencias de bajo nivel (8,17-19). La mayor parte de estas mutaciones se han descrito en la región reguladora del gen y originan una sobreexpresión del enzima que compensa la acción inhibidora del fármaco. También se han descrito mutaciones en la zona de interacción del enzima y la H (8,17-19).

Rifampicina:

La R, es un antimicrobiano semisintético cuyo uso en terapéutica se inició en el año 1967 (8). Es un potente inhibidor del ARN mensajero (ARNm) y, por tanto, de la transcripción genética. Su efecto es bactericida sobre las células de *M. tuberculosis* metabólicamente activas y esterilizante sobre las bacterias en estado de latencia (que sólo presentan ocasionalmente actividad metabólica), tanto en los focos necróticos como en el interior de los macrófagos (8,20). Dicha actividad junto con la inclusión de la Z en los esquemas terapéuticos, ha permitido acortar el tratamiento de la tuberculosis no complicada a 6 meses. El pico sérico a las 2-4 horas de una dosis oral de 600 mg es de 5-10 µg/ml. Entre sus efectos adversos se encuentran las molestias gastrointestinales y la afectación hepática (8-12,20). También desencadena reacciones de hipersensibilidad como fiebre, prurito, urticaria, vasculitis cutánea, eosinofilia, trombocitopenia, hemólisis o insuficiencia renal por nefritis intersticial (8-10). Tiñe la orina, el sudor y las lágrimas de color naranja. Una de sus principales características es su capacidad de inducción enzimática de los citocromos hepáticos por lo que puede disminuir las concentraciones séricas de

otros fármacos administrados concomitantemente como, entre otros, antirretrovirales inhibidores de la proteasa, anticonceptivos orales, anticoagulantes orales, corticoides y sulfonilurea (8-10,12,20).

La resistencia a la R se adquiere, en la mayoría de los casos, mediante mutaciones en el gen que codifica la subunidad beta de la polimerasa de ARN (*rpoB*). La resistencia a R se asocia a la resistencia a la H, con lo que su detección constituye un marcador de multirresistencia (8,17-19).

Pirazinamida:

La Z es un derivado sintético de la nicotinamida con un potente efecto esterilizante sobre los bacilos tuberculosos latentes. Cuando se utiliza asociada a la R, permite acortar la duración del tratamiento de la tuberculosis no complicada a 6 meses (8-10,20). Carece de actividad frente a las demás micobacterias, incluyendo otros componentes del complejo tuberculosis (8,20). La Z es un profármaco que es convertido a su forma activa, el ácido pirazinoico, por el enzima micobacteriana pirazinaminasa en el interior de los macrófagos donde se acumula intracelularmente. El ácido pirazinoico actúa sobre un enzima implicado en la síntesis de los ácidos micólicos (8).

El CIM promedio de *M. tuberculosis* es de 20 µg/ml. A las 1-4 horas de una dosis oral de 1 g se obtienen picos séricos de alrededor de 45 µg/ml. Dentro de sus efectos adversos se encuentran la hiperuricemia, la hepatotoxicidad y las alteraciones gastrointestinales. Excepcionalmente puede aparecer exantema y fotosensibilidad (8,12,20).

Las resistencias se deben fundamentalmente a mutaciones dispersas en el gen estructural *pncA* o en el promotor de la pirazinamidasa (8,17-19).

También existen cepas resistentes a la Z, sin mutaciones en el gen *pncA*, en las que esta resistencia se debe a otros mecanismos relacionados con la permeabilidad o el eflujo (9,22,23,24). Dos miembros del complejo tuberculoso, *M. bovis* spp. *bovis* y *M. bovis*-bacilo de Calmette-Guérin, son constitutivamente resistentes a la Z debido a una mutación puntual en el gen *pncA* (8).

Etambutol:

El E, etilen-diamino-dibutanol es un producto isómero dextrógiro derivado de la etilendiamina. Es activo frente a *M. tuberculosis*, con CIM de 1 a 5 µg/ml, aunque esta actividad requiere el crecimiento activo de las cepas susceptibles. El pico sérico a las 2-4 horas de una dosis oral de 1,5 g es de 5 µg/ml. Puede causar neuritis óptica, relacionada con la dosis y la duración del tratamiento (8,20).

Tiene una actividad variable sobre las demás especies de micobacterias de crecimiento lento y su actividad es mucho menor en las especies de crecimiento rápido (8,20). El E inhibe de forma específica la biosíntesis de la pared micobacteriana (8). Así, la resistencia al E se asocia con cambios en una región genómica definida, el operón *embCAB*, que codifica arabinosil transferasa (*EmbC*, *EmbA* y *EmbB* en *M. tuberculosis*) relacionadas con la síntesis de componentes de la pared celular como el arabinogalactano y el lipoarabinomanano (8,17-19). La resistencia de alto nivel (>20 µg/ml) se debe a un proceso múltiple que incluye como primer paso una sobreexpresión de las proteínas *Emb*, para posteriormente añadirse mutaciones en la región *EmbB* o

cambios adicionales en los niveles de expresión. Entre el 47 y el 69% de las cepas de *M. tuberculosis* presentan mutaciones en la región *EmbB* (8,19).

Estreptomina

La S es un antibiótico aminoglucósido que interfiere en la síntesis proteica bloqueando la traducción del ARNm (8). La CIM para las cepas sensibles oscila alrededor de 8 µg/ml a la 1-2 horas de una dosis intramuscular de 1g (8,20). Los efectos secundarios más importantes son las alteraciones vestibulares y con menos frecuencia las auditivas (8,20). En las micobacterias, el mecanismo conocido de resistencia a los aminoglucósidos es la alteración de la diana sobre la que actúan como consecuencia de mutaciones en los genes codificantes. Estas mutaciones afectan a los genes que codifican el 16S ARNr (*rrs*) y la proteína ribosomal S12 (*rpsL*). Las mutaciones que afectan al gen *rpsL* se dan en el 52-59% de las cepas resistentes y produce una resistencia de alto nivel (CIM > 500 µg/ml), mientras que las que afectan al gen *rrs* se observan en el 8-21% de las cepas y producen una resistencia de nivel intermedio (CIM 50-500 µg/ml) (8,17-19). En aproximadamente un tercio de las cepas resistentes existe un nivel de resistencia bajo (CIM 25-50 µg/ml) y no se detectan alteraciones en los genes *rpsL* o *rrs*. En estas cepas se ha sugerido un mecanismo de permeabilidad para justificar la resistencia (8,17-19).

Uno de los objetivos futuros del tratamiento de la TB es el estudio de la farmacogenómica, cuyo fin es conocer el comportamiento de los fármacos a través de información específica basada en secuencias de ADN genómico tanto del huésped como de la micobacteria. Dicha información puede revelar la sensibilidad de cada fármaco frente al agente específico, los niveles necesarios

en cada individuo y el riesgo de efectos adversos. El estudio de la farmacogenómica en tuberculosis ofrecerá en un futuro una terapia a medida de cada paciente y cada patógeno (8).

I.3. HEPATOTOXICIDAD SECUNDARIA A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS.

I.3.1. GENERALIDADES.

El diagnóstico de hepatotoxicidad secundaria a fármacos antituberculosos (HFAT) es un diagnóstico de exclusión basado en elementos clínicos y analíticos (12). El término hepatitis aguda se refiere a la presencia de inflamación hepática asociada con necrosis celular (citólisis). Su expresión clínico-patológica es muy variada y comprende desde alteraciones asintomáticas y reversibles en los enzimas hepáticos hasta la necrosis hepática masiva e insuficiencia hepática fulminante (12). El patrón de lesión depende del tipo celular preferentemente afectado, y aunque el hepatocito es la célula diana habitual, cualquier célula hepática (del epitelio biliar, endoteliales, de Ito, etc.) puede resultar afectada de forma aislada o en combinación. La hepatotoxicidad secundaria a drogas (HSD) se refiere a la capacidad de una droga para producir cualquier tipo de efecto adverso sobre el hígado, independientemente de su gravedad, tipo de lesión hepática o mecanismo de producción (21).

Según la OMS y del reciente consenso sobre HFAT de la American Thoracic Society (ATS), definimos HFAT de acuerdo con el nivel de transaminasas alcanzado en suero como elevaciones de alanina transaminasa (ALT) y/o aspartato transaminasa (AST) mayores de 3 veces del límite superior de la normalidad (LSN) [>120 unidades internacionales (UI)/ litro (L)] y/o elevaciones de la fosfatasa alcalina (FA) mayores de 2 veces el LSN o una elevación de la bilirrubina total mayor de 2 veces LSN si se asocia a cualquier elevación del nivel de ALT, AST o FA (12,22). La clasificación de gravedad de

hepatotoxicidad se realiza de acuerdo con el pico máximo de transaminasas alcanzado, definiéndose como hepatotoxicidad leve las elevaciones de la AST y/o ALT entre 3-5 veces los LSN (121-200 UI/L); moderada, elevaciones de 5-10 veces los LSN (201-400 UI/L); y grave, elevaciones >10 los LSN (> 400 UI/L) (12,22).

I.3.1.1. INCIDENCIA.

El número de fármacos, agentes químicos y xenobióticos capaces de inducir lesión hepática es elevado. A pesar de que el número de fármacos incriminados como causa de hepatotoxicidad es alto, la información epidemiológica sobre el efecto tóxico de los fármacos sobre el hígado es escasa y fragmentaria. Una de las razones es la dificultad de establecer la relación de causalidad entre un determinado acontecimiento hepático y la exposición a un agente farmacológico así como la imposibilidad de predecir de manera fiable, desde los estudios clínicos de la fase de desarrollo, la seguridad de un medicamento (23-25). La proporción real de casos de enfermedad hepática debida a fármacos es desconocida, aunque hoy en día ha desplazado a la etiología viral como la causa más frecuente de daño hepático agudo (12,22-25). Según datos publicados la HSD, supone un 7% del total de los efectos secundarios a medicamentos, es causa del 2% de las ictericias hospitalizadas y aproximadamente del 30% de los fallos hepáticos fulminantes (25-27).

La HFAT puede ocurrir durante el tratamiento con los regímenes con H, R, Z, E y fluorquinolonas utilizados tanto en el TITL como en el de la enfermedad tuberculosa (12). El uso de múltiples regímenes, el estudio de

distintas poblaciones, la existencia de diferentes definiciones de hepatotoxicidad y diferentes formas de monitorización clínico-analítica hace difícil conocer el riesgo individual de cada régimen. A pesar de estas dificultades, según los estudios, el riesgo de HFAT oscila entre el 5% y el 33% (12,28).

I.3.1.2. PATOGENIA.

La hepatotoxicidad puede ser resultado de la acción tóxica directa del fármaco, un metabolito o secundaria a una respuesta inmunológica que afecte a los hepatocitos, células biliares y/o la vasculatura hepática (12,21,23-25). En muchos casos, el mecanismo exacto y los factores contribuyentes a la toxicidad hepática son desconocidos.

En la hepatotoxicidad secundaria a tóxicos predecible, se reproduce en casi todos los individuos expuestos a partir de una determinada dosis, la toxicidad depende del grado de exposición y de la dosis administrada y generalmente es reproducible en animales de experimentación. El daño se produce por distintos mecanismos que incluyen la generación de radicales derivados del fármaco y de especies reactivas de oxígeno (estrés oxidativo), unión covalente a macromoléculas, disminución de glutatión, alteración de la homeostasis iónica, disfunción mitocondrial y alteraciones en el transporte de aniones a través de la membrana del hepatocito. Son las más fácilmente identificables y las que plantean clínicamente menos problemas (12,21,23-25).

En la hepatotoxicidad no predecible o idiosincrásica la toxicidad se manifiesta sólo en algunos individuos, con frecuencia sin dependencia de la

dosis e incluso tras un periodo de tolerancia. Responde básicamente a 2 posibles mecanismos:

- a) metabolismo anormal del compuesto en individuos susceptibles (individuos con predisposición genética), cuyo prototipo es la H, en los que, como consecuencia de una expresión diferente de enzimas de fase I y fase II se producen cantidades anormales de metabolitos tóxicos (idiosincrasia metabólica) (12,21,23-25,28).
- b) reacción de hipersensibilidad inmunitaria desencadenada por el fármaco con el resultado de un ataque por parte del sistema inmunitario hacia hepatocitos (hepatitis alérgica medicamentosa) (12,21,23-25).

Son las que plantean mayores problemas desde el punto de vista clínico, por lo inesperado y la posible gravedad de las lesiones. Hay ciertos hechos diferenciales que ayudan a distinguir la hepatitis alérgica de la secundaria a idiosincrasia metabólica: la primera se presenta siempre tras varias administraciones asintomáticas del fármaco (periodo previo de sensibilización), se observa una recurrencia de la lesión hepática tras la administración fortuita de una pequeña dosis, hay eosinofilia, fiebre e infiltrado inflamatorio en el hígado (12,21,23-25). Las lesiones hepáticas cuya causa es el metabolismo anormal del fármaco son, por el contrario dosis-dependiente en los individuos susceptibles y pueden aparecer tras la primera administración del medicamento (12,21,23-25).

I.3.1.3. PATRONES DE LESIÓN.

El daño causado al hígado por los fármacos afecta preferentemente a los hepatocitos, pero también puede ser causado sobre las células endoteliales

(enfermedad veno-oclusiva) y ductales (colangitis). No existe un patrón histológico ni marcadores analíticos específicos de la hepatitis tóxica, por lo que puede confundirse con otras hepatopatías. No obstante, pueden distinguirse algunos patrones de lesión característicos.

La necrosis hepatocelular es un tipo de lesión en la que predominan los efectos citotóxicos sobre los hepatocitos. Esto se traduce en cambios morfológicos importantes (vacuolización, esteatosis, acidofilia), necrosis celular y aumento de enzimas citosólicas hepáticas en el suero (21,23-25).

Entre las alteraciones celulares que no llevan a la muerte del hepatocito se encuentran la esteatosis y la colestasis (21,23-25). En las alteraciones colestásicas puras se produce una elevación de los valores de la FA y la biopsia muestra una ligera inflamación de la zona centrilobulillar. Se ve alterado el transporte de aniones (ácidos biliares y conjugados con ácido glucurónico), disminuyendo el flujo biliar. Cuando en el mecanismo de hepatotoxicidad se ven implicadas las células ductales se produce un aumento considerable de la gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT). En las colestasis mixtas existe tanto un componente colestásico como citotóxico, con la alteración morfológica de la zona periportal, elevación de los valores de FA y transaminasas. Por lo general, la esteatosis suele tener origen en una toxicidad mitocondrial y es consecuencia directa de una alteración del metabolismo lipídico. Los hepatocitos tienden a acumular triglicéridos, provocando acumulaciones de lípidos (21,23-25).

La hepatotoxicidad por idiosincrasia metabólica se manifiesta en los individuos susceptibles de manera dosis-dependiente y puede adoptar cualquiera de las formas antes mencionadas. En el caso de reacciones

idiosincrásicas por un mecanismo inmune pueden darse tanto citolisis como colestasis y al mismo tiempo estar asociadas otras manifestaciones típicas de reacciones de hipersensibilidad sistémicas (eosinofilia, rash) (21,23-25).

I.3.1.4. MEDICIÓN DE LAS ENZIMAS HEPÁTICAS.

El rango de los valores normales de las concentraciones séricas enzimáticas abarca 2 desviaciones estándar de la media de la distribución, con un 2,5% de personas sanas por encima y por debajo de los LSN (12,29). Las poblaciones utilizadas para determinar estas medidas estándar en el pasado es posible que incluyeran individuos con enfermedad hepática oculta, cuya exclusión llevaría a un descenso en el LSN. Debido a que pueden existir sustanciales diferencias en las mediciones entre los laboratorios se ha considerado estándar la comparación de múltiplos del LSN (30,31). En un mismo individuo, el valor de las transaminasas puede variar hasta un 45% en un mismo día, de forma que los niveles más elevados se registran por la tarde, o de un 10 a un 30% en días sucesivos. Los valores de AST y ALT pueden elevarse con el ejercicio físico, hemólisis y daño muscular. Además sus niveles tienden a ser superiores en el sexo masculino y en personas con índices de masa corporal (IMC) altos y menores en niños y mayores de 60 años (30,31).

I.3.1.5. MONITORIZACIÓN ANALÍTICA.

No se ha demostrado de forma rigurosa el beneficio de monitorizar los parámetros analíticos de función hepática para prevenir o reducir la gravedad de la HSD (12). Sin embargo, en el caso de la Z, algún estudio sugiere que la monitorización puede disminuir la gravedad de la hepatotoxicidad (32).

Las desventajas de la monitorización analítica son la cuestionable coste-eficacia de la realización de múltiples análisis en dicha afectación poco frecuente, la ausencia de límites enzimáticos claramente establecidos para discontinuar la medicación y la confusión de la adaptación hepática con el daño hepático.

El diagnóstico de HSD puede ser difícil en pacientes con niveles basales de transaminasas anormales o fluctuantes; en estos casos especialmente, la monitorización analítica puede detectar hepatotoxicidad antes de que aparezca la clínica (12).

I.3.1.6. SÍNDROMES CLÍNICOS DE HEPATOTOXICIDAD SECUNDARIA A DROGAS.

Adaptación hepática: es la respuesta fisiológica adaptativa a la exposición farmacológica que se produce por la inducción de genes de supervivencia incluyendo aquellos que regulan las vías metabólicas antioxidantes, antiapoptóticas y antiinflamatorias dando lugar a una atenuación de las respuestas hepatotóxicas. Dicha respuesta adaptativa también puede estimular la proliferación de los hepatocitos y su adaptación a la exposición al fármaco.

Se caracteriza por elevaciones transitorias asintomáticas de las transaminasas (ALT y/o AST). Dicha respuesta no suele ocasionar inflamación, muerte celular o cambios histopatológicos llamativos (12). Algunos tóxicos como el etanol, pueden interferir en la respuesta adaptativa protectora. También se ha observado que la persistencia de la misma puede dar lugar, en

algunas circunstancias, a que los hepatocitos sean más vulnerables en caso de una nueva exposición a agentes hepatotóxicos (12).

Una de las formas de adaptación hepática más estudiada es la inducción de los enzimas hepáticos microsomales (citocromo P450), capaces de metabolizar la medicación que produce su inducción (25).

Según el valor de las transaminasas séricas, se define como niveles de de AST y/o ALT menores de 3 veces el LN (120 UI/L) . Su pronóstico es favorable de forma que raramente evoluciona a inflamación, muerte celular u otros cambios histológicos significativos (12,22).

Hepatitis aguda: se trata de una necrosis de hepatocitos de magnitud variable, generalmente con infiltrado inflamatorio. Es característico de la etiología tóxica el predominio centrilobulillar de las lesiones. Ocurre presumiblemente por la bioactivación de los compuestos en el citocromo P-450, al generarse intermediarios reactivos hepatotóxicos que se unen covalentemente a proteínas o al ADN celular (25).

El cuadro clínico simula el de una hepatitis viral aguda con malestar general, astenia y anorexia, y la alteración biológica más frecuente es una marcada elevación de AST y ALT, con mínimos incrementos o normalidad de GGT y FA.

Su diagnóstico se basa en los niveles séricos de transaminasas con síntomas o no de hepatitis (anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal y fatiga).

El pronóstico inmediato de la lesión hepatocelular aguda depende de la extensión de la necrosis parenquimatosa. La presentación con ictericia (que traduce una extensa necrosis hepatocitaria) conlleva una mortalidad global de

un 10-15%. Un elevado porcentaje de estos casos de fallecimiento se debe a una evolución fulminante de la reacción hepatotóxica (12,21,23-25).

Esteatosis hepática no alcohólica: variedad grave de hepatotoxicidad cuyo mecanismo subyacente parece ser una lesión mitocondrial inducida por el fármaco o sus metabolitos. La presencia de microvesículas de grasa en los hepatocitos constituye el sustrato de lesión característica (12,21,23-25). Se trata de un síndrome de curso agudo y en ocasiones fulminante más frecuentemente relacionado la terapia antirretroviral, el ácido valproico, la amiodarona y el ácido acetilsalicílico.

Clínicamente se caracteriza por síntomas inespecíficos (náuseas, astenia, anorexia y pérdida de peso). Los niveles de transaminasas se incrementan, aunque sin alcanzar la magnitud de los incrementos que ocurren en la lesión hepatocelular aguda.

Aunque es posible un curso benigno con recuperación completa si se interrumpe la administración del medicamento es posible la progresión del daño a esteatohepatitis, caracterizada histiopatologicamente por inflamación hepática e infiltración grasa con el consecuente elevado riesgo de cirrosis (12,21,23-25).

Hepatitis granulomatosa: la presencia de granulomas en el hígado es un hallazgo inespecífico que puede ser secundario a infecciones, enfermedades inflamatorias o neoplasias. Este tipo de lesión es típica de las reacciones inmunitarias por hipersensibilidad desencadenadas por fármacos como el alopurinol, la quinidina, las sulfamidas y la pirazinamida. El daño puede ocurrir de forma tardía o ante una exposición repetida tras un intervalo de tiempo.

Clínicamente puede existir fiebre, letargia, rash, adenopatías, hepatoesplenomegalia, eosinofilia, aumento de ALT y, en ocasiones, vasculitis (12,21,23-25).

Colestasis: se caracteriza por una elevación asintomática generalmente reversible de la FA y bilirrubina séricas secundaria a un fallo del transporte de bilirrubina. Es típica su relación con el tratamiento estrogénico. No se caracteriza por inflamación en el parénquima hepático (12,21,23-25).

I.3.2. HEPATOTOXICIDAD DURANTE EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE.

I.3.2.1. PAUTAS CON ISONIACIDA EN MONOTERAPIA.

La H es el FAT que más frecuentemente produce hepatotoxicidad. Su amplia utilización desde el año 1952 tanto en combinación para el tratamiento de la TB como en monoterapia en el TITL ha permitido un estudio muy preciso de su hepatotoxicidad intrínseca (9-12,28,32-36).

A. INCIDENCIA.

Según datos procedentes de programas de vigilancia farmacológica, se ha observado que aproximadamente un 1-36% de los pacientes que reciben H en monoterapia desarrollan un incremento de las transaminasas séricas durante el curso de tratamiento (12,28,32-40). Dichas elevaciones suelen ocurrir en las primeras 10 semanas de tratamiento, son habitualmente leves (incrementos inferiores a 5 veces los LSN), asintomáticas, no se acompañan de enfermedad hepática y recuperan sus cifras normales a pesar de continuar con la

medicación (12,28,33-40). La afectación hepática de mayor gravedad es mucho menos frecuente registrándose entre el 0,1 y 5% y con una mortalidad entre 0-90/100.000 personas-año (12,28,33-40).

Aunque no está del todo claro, las diferencias existentes entre los diferentes estudios parecen explicarse por variaciones en el tamaño muestral, diferentes criterios de selección de pacientes, diferente monitorización clínico-analítica, variaciones en los puntos de corte definitorios de hepatotoxicidad y la posible existencia de potenciales factores de confusión causantes de hepatotoxicidad (12,33,36,40,41). Por ello, la determinación del riesgo de hepatotoxicidad secundaria a H debe ser realizada con cautela teniendo en cuenta las limitaciones y la metodología de cada estudio.

El tipo de controles (clínicos y/o analíticos) que se realizan a los pacientes a tratamiento con H para el TILT ha sido uno de los factores más importantes en estas variaciones. Kopanoff *et al* en un estudio multicéntrico del Servicio de Salud Pública de EE.UU. realizado con 13.838 pacientes comunican una incidencia de hepatotoxicidad por H del 0,6% (40). En un estudio más reciente con 11.141 pacientes Nolan *et al* diagnostican de hepatitis por H al 0,1% de los sujetos (36). En ambos estudios no se llevaron a cabo controles analíticos sistemáticos de las pruebas de función hepática, que sólo se realizaban ante la presencia de algún síntoma o signo sugestivo de hepatitis.

La realización de controles de forma rutinaria probablemente aumentaría el número de pacientes a los cuales se diagnostica de hepatotoxicidad (36,41). En el reciente estudio de Fountain *et al* en el que se incluyeron 3.377 pacientes a tratamiento con H se observó una incidencia de

hepatotoxicidad por H (incrementos superiores a 5 veces los valores de normales de referencia) de 5,6 por 1.000 pacientes encontrando como factores de riesgo de la misma la edad mayor de 49 años y la elevación de los niveles basales de AST (42). Observaron que la HFAT moderada-grave es frecuentemente asintomática, dato a favor de la necesidad de monitorización analítica de estos enfermos. No se registró ningún fallecimiento por esta causa (42). Sin embargo, en el estudio multicéntrico de Kopanoff *et al* la incidencia de hepatitis de curso fatal fue de 56/100.000 personas-año, estudio en el que no se realizó monitorización de las pruebas de función hepática en ausencia de datos clínicos sugestivos de hepatitis (40).

B. PATOGENIA.

La patogenia de la hepatotoxicidad por H no ha sido completamente establecida. Los mecanismos de hipersensibilidad son poco frecuentes (12,25,28). El mecanismo más común se debe a la acción de los metabolitos tóxicos derivados de su metabolismo (12,28). El conocimiento del metabolismo hepático de la H ha permitido estudiar la relación entre la actividad de los enzimas que intervienen en las reacciones metabólicas y la susceptibilidad de hepatotoxicidad de forma que el riesgo es mayor cuando coinciden una serie de factores ambientales (enfermedades asociadas o inducción enzimática) y/o genéticos, que favorecen el desequilibrio entre la generación de metabolitos hepatotóxicos en la fase I del metabolismo hepático del fármaco y la tasa de su posterior inactivación (12,21,28).

La degradación de la H es fundamentalmente hepática principalmente por acetilación por los enzimas N-acetiltransferasa 2 (NAT2) (28) dando lugar a

acetilisoniacida que es metabolizada mediante una reacción de hidrólisis a monoacetilhidracina (MAH), pudiendo ser metabolizada de dos formas posibles: 1) por oxidación a través de los enzimas del grupo CYP2E1 del citocromo P-450, dando como resultado metabolitos hepatotóxicos (28) y 2) por una nueva acetilación a través del NAT2 formando diacetilhidracina, molécula no hepatotóxica (28) (Figura 1). La otra vía alternativa del metabolismo de la H también responsable de la generación de metabolitos intermediarios tóxicos es su hidrólisis directa a MAH (28) (Figura 1).

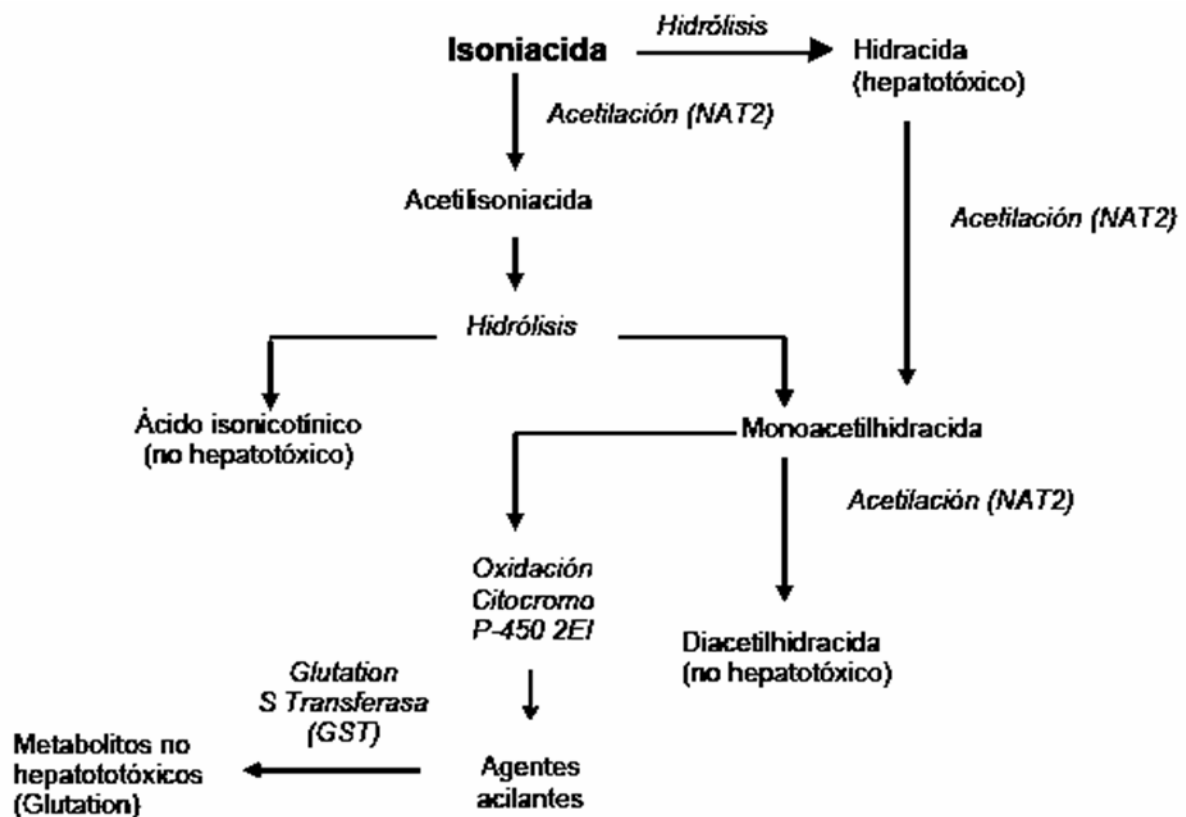


Figura 1: Esquema representativo del metabolismo hepático de la H que incluye los enzimas responsables de las diferentes reacciones y las sustancias tanto hepatotóxicas como no hepatotóxicas derivadas de su metabolismo.

Las hepatotoxinas derivadas de la oxidación de MAH por las enzimas del grupo CYP2E1 son inactivadas por glucuronación con el glutathion a través de

las enzimas del grupo glutathion S-transferasa (GST) (28). Por lo tanto, existen dos grupos enzimáticos que intervienen en las reacciones fase I del metabolismo hepático de la H (acetilación y oxidación), NAT2 y CYP2E1, y otro, el GST, responsable de la inactivación de hepatotoxinas derivadas del metabolismo hepático (reacción de glucuronación), cuya actividad va a influir en el riesgo de hepatotoxicidad según la acumulación de metabolitos tóxicos. Por ello, varios estudios se han centrado en el estudio del riesgo asociado a la actividad de dichos grupos enzimáticos (37-39, 43-50). Los grupos enzimáticos de mayor importancia se exponen a continuación:

NAT2: grupo enzimático que determina un fenotipo acetilador lento, intermedio y rápido (37-39,43-50). En los acetiladores rápidos, más del 90% de la droga es excretada como acetilisoniacida, mientras que en los lentos sólo el 67% se excreta como acetilisoniacida siendo el resto de la droga excretada por la orina.

La influencia de la velocidad de acetilación en la hepatotoxicidad por H es controvertida. En la mayoría de los estudios sobre el tema se incluyeron pacientes bajo regímenes de tratamiento que incluían varios FAT y la metodología del análisis fenotípico del estatus acetilador fue imprecisa (12,39), de modo que los acetiladores rápidos podrían haber sido identificados falsamente como lentos en el caso de la existencia de un retraso en la velocidad de absorción del fármaco según la extracción de las muestras de sangre en tiempos establecidos (12,46,50). Debido a la hepatotoxicidad de la MAH, se sugirió que la H era más nociva para los acetiladores rápidos que para los lentos, debido a la formación del metabolito tóxico con mayor rapidez. Sin embargo, los acetiladores rápidos degradaban la MAH con mayor rapidez en

un metabolito no tóxico, la diacetilhidracida, por lo que también se pensó que la hepatotoxicidad era mayor para los acetiladores lentos (50).

En la literatura médica existen tanto, estudios en los que la susceptibilidad de hepatotoxicidad por H es mayor en los acetiladores lentos como, estudios en los que no existe ninguna correlación entre la misma y el estatus acetilador (12,50). Debido a la controversia del tema, la opinión de muchos autores es que el riesgo sería similar en los dos fenotipos, por lo que no es necesaria la determinación del estado acetilador (12,50).

Se ha observado en estudios de genotipificación del *NAT2* mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) que ciertos polimorfismos genéticos que determinan velocidades de acetilación lentas se relacionan con un mayor riesgo de HFAT (39,43-46).

CYP2E1: grupo de enzimas microsomales, inducidos por el alcohol, expresados en el hígado y en otros órganos como el riñón, pulmón, mucosa nasal, cerebro y linfocitos (51). Dicho citocromo posee un papel muy importante en la detoxificación clínica dado que participa en el metabolismo de numerosas sustancias (hidrocarburos aromáticos y halogenados, anestésicos halogenados, alcoholes, nitrosaminas...) (51,52).

En el caso del metabolismo de los FAT, los metabolitos hepatotóxicos generados por la actividad oxidativa de este grupo enzimático (Figura 1) podrían tener una relación con el riesgo de hepatotoxicidad. Se han descrito polimorfismos genéticos del *CYP2E1* que determinarían variaciones en la actividad de este grupo enzimático (37,38,45,47), cuyo significado clínico no está claro debido a que no se ha demostrado una asociación convincente entre su actividad catalítica y sus genotipos (51,52).

GST: grupo de enzimas fase II muy importantes en la detoxificación de muchas sustancias hepatotóxicas. La presencia en homocigosis del alelo mutante nulo *GSTM1* o *GSTT1* se ha correlacionado con una pérdida de la actividad enzimática (53) y un mayor riesgo de toxicidad por FAT (48,49).

C. FACTORES DE RIESGO.

La frecuencia y gravedad de la hepatotoxicidad secundaria a H se ha relacionado con la edad, la ingesta de alcohol o de otras drogas, las alteraciones de las pruebas de función hepática, factores genéticos y la desnutrición (12). En algunos países asiáticos donde la hepatitis B es endémica y son frecuentes la malnutrición, las enfermedades parasitarias o el alcoholismo y el uso de otras drogas, la incidencia de hepatitis por H es superior a la encontrada en los estudios realizados en otros países (41).

El factor de riesgo más estudiado ha sido la edad. En mayores de 35 años la incidencia de hepatotoxicidad por es entre 1,8 y 3,3 veces mayor que en los menores de esta edad (36,40). En el estudio de Kopanoff *et al* esta complicación fue muy rara en menores de 20 años pero casi alcanzó el 2% en los pacientes entre 50 y 64 años (40). El estudio de Fountain *et al* evidenció una elevación de AST más de cinco veces los valores normales específica según la edad que osciló entre el 0,44% en pacientes menores de 35 años y el 2,08% en pacientes mayores de 49 años (42), con diferencias estadísticamente significativas.

Estos estudios también han evaluado la influencia del sexo en el riesgo de hepatotoxicidad secundaria a H encontrándose únicamente en el estudio de Nolan *et al* un mayor riesgo no significativo a favor de las mujeres (36).

Kopanoff *et al* observaron una mayor gravedad de la hepatotoxicidad en las mujeres, de modo que 7 de las 8 muertes que se produjeron del total de 13.838 pacientes procedían de uno de los centros (Baltimore) y 5 eran mujeres de raza negra (40). Años más tarde se publicó que en Baltimore la incidencia de cirrosis hepática era muy superior a la descrita en el resto del país, lo que puede indicar una posible influencia de las enfermedades hepáticas previas sobre la mortalidad en la hepatitis por H. Otro estudio que revisa los casos fatales de hepatotoxicidad por H sugirió que las mujeres tienen más riesgo de muerte (54).

Se ha descrito que los pacientes con ingesta excesiva de alcohol presentan un riesgo de hepatitis por H entre 4 y 17,3 veces superior (12,40). En dos estudios realizados en una cohorte de usuarios de drogas, de los cuales más de la mitad presentaban anticuerpos del virus de la hepatitis C (anti-VHC) positivos, el consumo elevado de etanol se asoció de forma independiente con la hepatotoxicidad por H (33,55-58). Esto se ha relacionado con una posible disminución del glutatión hepático, lo que dificultaría la detoxificación de los metabolitos reactivos de la H junto con la acción inductora que el etanol realiza sobre el citocromo P-450 (21,26).

El uso concomitante de otros fármacos como la R, Z, el paracetamol, los anticonvulsivantes, hipolipemiantes, anestésicos generales, el metotrexato, la sulafasalazina y los inhibidores del factor de necrosis tumoral también aumenta el riesgo de las complicaciones hepáticas de la H (12,36,59).

Uno de los efectos menos estudiados y controvertido es la influencia de las hepatopatías crónicas previas (12,21). El término “hepatopatía crónica” en la literatura médica se ha englobado en un grupo heterogéneo, desde hepatitis

víricas crónicas, muchas veces basándose únicamente en la positividad de las serologías para la hepatitis B (VHB) o la hepatitis C (VHC), el etilismo crónico con leves alteraciones de las transaminasas o con una verdadera hepatopatía alcohólica, las esteatosis hepáticas de múltiples etiologías, las alteraciones idiopáticas de las pruebas de función hepática, hasta los casos de cirrosis hepática con insuficiencia hepatocelular más o menos establecida (12,35). La enfermedad hepática crónica, si se encuentra estabilizada, no se considera una contraindicación para la administración de los principales FAT (9-12).

Con respecto a la hepatitis B crónica y su papel en el daño hepático producido por la H existen varios estudios realizados en individuos procedentes del Sudeste Asiático, donde esta infección es endémica (41,60). Patel *et al* encontraron una incidencia de elevaciones asintomáticas de las transaminasas por la H en el 3% de los sujetos con negatividad del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), en el 7% de los HBsAg positivos pero con negatividad del antígeno E de la hepatitis B (HBeAg) y en el 48% de los HBsAg y HBeAg positivos. Los 3 casos de hepatotoxicidad grave ocurrieron en pacientes de este último grupo. Los autores concluyeron que la hepatotoxicidad por H es más frecuente y más grave en los pacientes con una mayor replicación activa del virus, determinada por la positividad del HBeAg (41). Mc-Glynn *et al* no encontraron un riesgo superior de toxicidad de la H en portadores del HBsAg frente a la población no portadora, aunque estos pacientes presentaron una mayor frecuencia de elevaciones leves de las transaminasas que los negativos para el HBsAg (60).

Mucho menos estudiada ha sido la relación entre el VHC y la hepatotoxicidad secundaria a H en monoterapia. Sadaphal *et al*, en un estudio

no controlado, analizaron la hepatotoxicidad de la H en una cohorte de de usuarios de drogas por vía intravenosa activos, en los que se indicó el fármaco para el TITL (55). De los 146 que recibieron el tratamiento durante más de una semana, 138 (95%) eran anti-VHC positivos y 37 (25%) positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Treinta y dos (22%) desarrollaron elevaciones por encima de 3 veces los LSN, siendo este incremento superior a 5 veces los LSN en 13 (9%). El único factor que se asoció con la hepatotoxicidad fue el consumo excesivo de alcohol. El escaso número de pacientes anti-VHC negativos, no permite en opinión de los autores, extraer conclusiones sobre el papel que el VHC puede jugar en el desarrollo o la gravedad de la hepatitis secundaria a H, al no existir un grupo control. Fernández-Villar *et al*, evaluaron la incidencia y los factores de riesgo de hepatotoxicidad en una cohorte de 415 usuarios de drogas a los que se indicó H para el TITL (56). Veinte pacientes (4,8%) presentaron elevaciones de las transaminasas superiores a 5 veces los LSN, siendo este incremento superior a 3 veces los LSN en 54 pacientes (13%) (56). En el análisis multivariante los únicos factores de riesgo de hepatotoxicidad secundaria a H fueron el consumo excesivo de alcohol y la presencia de transaminasas basales elevadas. La positividad para VHC se asoció con la hepatotoxicidad por H sólo en el análisis univariante. Sin embargo, en un análisis posterior en el que se definió hepatotoxicidad ante la presencia de niveles de transaminasas basales por encima de 3 veces los LSN, la positividad para VHC se asoció de forma independiente con el riesgo de hepatotoxicidad secundaria a H (57). Los autores observaron que la hepatotoxicidad por H era significativamente más frecuente en los pacientes VHC positivos con niveles de transaminasas basales

elevados (3% vs. 11,4%; $p= 0,2$). Este hecho podría explicarse porque los pacientes con transaminasas basales elevadas tienen más riesgo de hepatotoxicidad por H debido a la presencia de una hepatitis más activa. En un estudio posterior en el que el diagnóstico de VHC se basó en la determinación de ARN-VHC se confirmó que la infección por VHC es un factor de riesgo independiente de hepatotoxicidad por H (57,58).

En los últimos años se han publicado varios estudios sobre las variantes genéticas de los principales enzimas implicados en el metabolismo de los FAT y su influencia en el riesgo de hepatotoxicidad.

En cuanto a las pautas de monoterapia con H para el TITL solamente existe un trabajo en población adulta en el que se estudiaron los polimorfismos del *NAT2* y del *CYP2E1* (37). Los investigadores encontraron una asociación significativa entre el riesgo de elevaciones de las transaminasas (AST y/o ALT > 45 UI/L con o sin síntomas) y el genotipo *c1A/c1A* del *CYP2E1* (OR= 3,4; IC 95% 1,1-12; $p= 0,02$) y una tendencia no significativa para el riesgo de hepatotoxicidad (AST y/o ALT \geq 165 UI/L con o sin síntomas) (37).

En contraste con otros estudios realizados en pacientes a tratamiento de la enfermedad tuberculosa con pautas que incluyeron, al menos H, R y Z, (39, 43-46) no se encontró ninguna asociación entre el riesgo de hepatotoxicidad y los polimorfismos del *NAT2* determinantes de un fenotipo acetilador lento. Vuilleumier *et al* argumentaron que los diferentes resultados obtenidos podrían tener explicación en la heterogeneidad racial de la población estudiada, el pequeño tamaño muestral, las variaciones en la distribución genotípica del *NAT2* entre las diferentes poblaciones y en las diferencias en la dosificación de

H entre los diferentes estudios así como la presencia de tratamiento concomitante con otros fármacos (37).

I.3.2.2. PAUTAS CON RIFAMPICINA EN MONOTERAPIA.

A. INCIDENCIA.

Existen cinco estudios que nos aportan datos sobre el uso de la R para TITL. En el ensayo clínico con pautas de H, R y HR en combinación realizado en Hong Kong (61) en el que se incluyeron 679 varones con silicosis se observó una mayor frecuencia de elevaciones de las transaminasas por encima de los LSN en los pacientes en cuyo tratamiento se incluía la H comparado con el grupo de pacientes que recibía tratamiento con R en monoterapia. En dicho grupo no se observó ningún caso de hepatotoxicidad. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las medias geométricas de los niveles de ALT entre los grupos a tratamiento con placebo y con R.

En un segundo estudio llevado a cabo en Boston en 204 indigentes, ninguno de los 49 pacientes del grupo de la R en monoterapia tratados durante 6 meses presentó hepatitis sintomática (62).

En otro estudio randomizado de H vs. R más reciente, llevado a cabo en Canadá, tampoco se observaron elevaciones significativas del nivel de transaminasas en el grupo de 53 pacientes de los cuales el 80% había completado un régimen de 4 meses con R y todos los pacientes que desarrollaron hepatotoxicidad eran del grupo de la H (63).

Recientemente se publicó un estudio retrospectivo descriptivo que compara diferentes aspectos del TITL en monoterapia con H y R. En el análisis

de la frecuencia de hepatotoxicidad no se encontró ningún caso dentro del grupo bajo tratamiento con R (64). Por último, Villarino *et al* comunicaron 4 (2,5%) casos de elevación de la ALT de al menos 2 veces los LSN en su serie de 154 adolescentes tratados con R (65).

Estos datos, aunque limitados, nos indican que la monoterapia con R presenta un riesgo bajo de hepatotoxicidad.

B. PATOGENIA.

Tal y como se expuso anteriormente el daño hepatocelular es infrecuente. Su patogénesis es desconocida aunque parece que el mecanismo de producción podría ser una reacción de hipersensibilidad, habiéndose descrito en combinación con disfunción renal, anemia hemolítica y síndrome pseudogripal (8-12,20).

Ocasionalmente, al inicio del tratamiento, este fármaco puede competir con la excreción de bilirrubina dando lugar a hiperbilirubinemia generalmente asintomática y transitoria ya que posteriormente, probablemente como resultado de la inducción enzimática de la R, se incrementa la producción de glucurónido de bilirrubina, con incremento de la excrección biliar y normalización de los niveles de bilirrubina (12).

Un aspecto ampliamente estudiado es su capacidad de inducción enzimática de enzimas metabolizadoras y transportadoras de fármacos y xenobióticos. La aplicación de técnicas de biología molecular a permitido conocer que la R interactúa con los receptores pregnane X (PXN) de los hepatocitos estimulando la transcripción génica de los genes que codifican a citocromos, glucuroniltransferasas y proteína transportadora de membrana p-

glicoproteína. Los tres complejos enzimáticos juegan un importante papel en el metabolismo tanto de la propia R como de otros fármacos y sustancias (66). Por lo tanto la R puede interaccionar con muchos fármacos como la H, warfarina, prednisona, digoxina, quinidina, ketokonazol, itraconazol, propanolol, clofibrato, sulfonilureas, fenitoína, inhibidores de la proteasa e inhibidores de la transcriptasa inversa (12).

C. FACTORES DE RIESGO.

La R puede producir daño hepático con más frecuencia en pacientes con hepatopatía crónica (12). Las interacciones con otros fármacos con capacidad de producir hepatotoxicidad constituye un importante factor de riesgo ya que la inducción de los citocromos puede incrementar la cantidad de hepatotoxinas. En resumen, la R parece ser un fármaco potenciador de la toxicidad hepática de otros fármacos (12).

I.3.2.3. REGIMENES COMBINADOS.

La larga duración de los TITL con H, añadido a la situación asintomática del paciente con infección tuberculosa latente hace difícil lograr una buena adherencia al tratamiento, por lo que son frecuentes los incumplimientos y abandonos, que cuestionan el porcentaje de efectividad de los mismos (11,67,68). Este grave inconveniente ha tratado de evitarse en los últimos años con pautas más cortas que utilizan la asociación de dos fármacos.

A. PAUTAS CON ISONIACIDA Y RIFAMPICINA.

Un estudio realizado en Canadá comparó una cohorte de 591 pacientes que recibieron TITL con H y R intermitente dos veces a la semana con una cohorte histórica de 403 pacientes que recibieron H en monoterapia, observando un porcentaje de hepatotoxicidad similar en ambos grupos (69).

En el metanálisis de Steele *et al* que incluye pacientes con enfermedad tuberculosa se estimó una prevalencia de hepatitis sintomática con la combinación de H y R del 2,55%, incidencia mayor que en los regímenes con dichas drogas por separado (34).

B. PAUTAS CON RIFAMPICINA Y PIRAZINAMIDA.

Los ensayos clínicos iniciales con pautas de R y Z durante dos meses realizados en pacientes VIH positivos, mostraron una eficacia e incidencia de hepatotoxicidad similares a la monoterapia con H (70,71). Posteriormente se describieron un importante número de casos de hepatotoxicidad grave, algunos de ellos con resultado fatal (72).

Existen, al menos, 5 estudios en la población general que confirman estos hallazgos (32,73-76). La ATS y los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) revisaron estas recomendaciones (72), indicándose que las pautas combinadas de R y Z no deberían ser utilizadas en pacientes con enfermedades hepáticas preexistentes, abuso de alcohol o antecedentes de hepatotoxicidad por la H (72), y que su utilización obliga a la realización de controles clínicos y analíticos cada dos semanas. Los datos combinados de estos 5 trabajos incluyeron 1.311 pacientes, y aunque se llevaron a cabo en diferentes tipos de poblaciones, la incidencia de hepatotoxicidad moderada-

grave (elevaciones de las transaminasas por encima de 3-5 veces los LSN) es más o menos uniforme y se encontró en el 5,8%.

La Z en monoterapia no ha sido utilizada para el TITL, por lo que no disponemos de datos que permitan conocer su frecuencia de hepatotoxicidad intrínseca. Sin embargo, disponemos de datos procedentes de trabajos en los que se utilizó en combinación con E y fluorquinolonas, fármacos que raramente producen hepatitis. En un estudio en el que se utilizó en combinación con E se observaron elevaciones de las transaminasas mayores de 4 veces los LSN en 7 de 12 (58%) pacientes (77). En otro trabajo en el que se utilizó con levofloxacin para el TITL tras exposición a TB MR, 3 de 17 (18%) pacientes presentaron elevaciones de transaminasas por encima de 4 veces los LSN (78). En otro trabajo en el que se utilizó en combinación con ofloxacin, 9 de 22 (41%) pacientes desarrollaron elevaciones de las transaminasas mayores de 4 veces los LSN (79). Estos datos apuntaron a la Z como causante de hepatotoxicidad.

Aunque se desconocen múltiples aspectos acerca del mecanismo de producción de hepatotoxicidad se cree que el daño hepático puede ser producido tanto por un mecanismo de idiosincrasia metabólica dosis dependiente como por una reacción de hipersensibilidad (12).

La Z es un derivado del ácido nicotínico, y su estructura molecular es similar a la H. La molécula de Z es metabolizada a ácido 5-hidroxi-pirazinoico por los complejos enzimáticos xantino-oxidasa, aldehído-oxidasa y xantino-deshidrogenasa (8,12). La vida media ($t_{1/2}$) de la pirazinamida es mayor que la de las de la H y R, siendo aproximadamente de 10 horas, que puede incrementarse a 15 horas en pacientes con enfermedad hepática (8,12). Varias

décadas atrás se observó que dosis diarias de 40-50 mg/Kg de Z producía hepatotoxicidad en la mayor parte de los pacientes de forma dosis dependiente (12).

En un estudio realizado en roedores de experimentación se comprobó que la Z altera los niveles de nicotinamida-acetil-deshidrogenasa en el hígado produciendo radicales libres, tóxicos para el hígado (80).

Debido a la similitud de la estructura molecular de la H y la Z es posible que esta última pueda producir daño hepático por el mismo mecanismo que la H. Se ha visto una mayor incidencia y gravedad de hepatotoxicidad en pacientes con R y Z para el TITL con historia previa de hepatotoxicidad secundaria a H (72).

Se ha documentado que la Z puede producir hepatotoxicidad mediada por un mecanismo de hipersensibilidad acompañada de eosinofilia o hepatitis granulomatosa (8,12). También se ha descrito mayor hepatotoxicidad en combinación con alopurinol fármaco que inhibe los enzimas xantino-oxidasa, lo cual da lugar a una disminución del aclaramiento de la Z y un acúmulo de sus metabolitos (12).

En resumen, la capacidad de la Z para aumentar la frecuencia y gravedad de la hepatotoxicidad demostrada por todos estos estudios y a pesar de la disparidad con los estudios realizados en pacientes VIH en los cuales los índices de hepatotoxicidad con esta pauta parecen ser menores (81,82), las guías actúales recomiendan no utilizar la combinación HZ en general (72).

1.3.3. HEPATOTOXICIDAD DURANTE EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA CON ISONIACIDA, RIFAMPICINA Y PIRAZINAMIDA.

El estudio de la hepatotoxicidad secundaria a los regimenes de tratamiento de la enfermedad tuberculosa que contienen al menos H, R y Z en combinación es difícil ya que los tres fármacos poseen capacidad hepatotóxica intrínseca. La probabilidad de hepatotoxicidad no solamente es el resultado de la suma de la probabilidad individual de cada agente particular, sino que también hemos de considerar que las interacciones farmacológicas entre ellos pueden aumentar el riesgo de hepatotoxicidad.

1.3.3.1. INCIDENCIA.

La incidencia de hepatotoxicidad y sus diferentes formas clínicas en pacientes que reciben tratamiento con H, R y Z han variado considerablemente en la literatura médica, oscilando entre 5% y 33% (12,28,35,50).

Aunque no está del todo claro, estas diferencias podrían explicarse por los distintos criterios utilizados para la definición de la hepatotoxicidad, muchas veces ante elevaciones leves en pacientes asintomáticos, las características y factores de riesgo de las poblaciones estudiadas, la zona geográfica, la asociación con otros fármacos hepatotóxicos o el tipo de monitorización y controles realizados a los pacientes durante su seguimiento (12,28,35,50). Esto dificulta la comparación entre los diferentes estudios.

En el metanálisis de Steele *et al* que incluye estudios con varios regimenes de tratamiento se observa que la combinación de H y R aumenta la

incidencia de hepatotoxicidad en adultos del 1,6% en pautas con H en monoterapia al 2,55% (34).

La contribución de la Z al desarrollo de hepatotoxicidad es controvertida. Algunos trabajos no muestran prácticamente ningún aumento, sin embargo, en otros estudios la Z contribuye significativamente a aumentar tanto la incidencia como la gravedad de la hepatotoxicidad (12). Las diferencias en los datos procedentes de la literatura probablemente se deben a las diferentes dosis y criterios de selección utilizados de los pacientes seguidos (12).

1.3.3.2. PATOGENIA.

La patogenia de la hepatotoxicidad secundaria a la combinación de los tres fármacos no ha sido claramente establecida. La R raramente es hepatotóxica *per se*, pero puede aumentar la hepatotoxicidad secundaria a la H. Sin embargo, tanto la H como la Z son claramente hepatotóxicas. Una de las cuestiones más difícil de resolver cuando la hepatotoxicidad aparece es saber si se debe a la H, a la Z o a su combinación.

Durand *et al*/ sugieren la existencia de dos patrones de hepatotoxicidad en los pacientes que reciben la combinación de los tres fármacos (82). El primero se caracteriza por una elevación de las transaminasas séricas, que ocurre al inicio del tratamiento (normalmente dentro de los primeros 15 días). Dicho patrón parece estar relacionado con la acción inductora de la R de la toxicidad hepática de la H, patrón también observado en pacientes a tratamiento con H y R en combinación. La hepatitis tóxica en estos casos es de buen pronóstico, incluso ante la presencia de hepatitis fulminante. El segundo patrón de hepatotoxicidad se caracteriza por un aumento de las transaminasas

séricas que ocurre un mes después de comenzar el tratamiento. El pronóstico de estos pacientes no es tan favorable (82).

Se ha visto que las tres drogas pueden dar lugar a un incremento de la producción de oxidantes tanto por un aumento de la peroxidación lipídica (83) como por alteración de los niveles de nicotinamida acetil-deshidrogenasa (84). Los metabolitos tóxicos derivados del metabolismo de la H, cuya producción aumenta con la R, son los posibles causantes de hepatotoxicidad. Sin embargo, no se ha observado una correlación entre los niveles séricos de los fármacos y el daño hepático (85). Por lo tanto se trata de una hepatotoxicidad no predecible (idiosincrasia metabólica).

Otro posible mecanismo es la hipersensibilidad farmacológica, especialmente en pacientes en los que la hepatitis se acompaña de rash cutáneo, fiebre, artralgias y eosinofilia. Como se ha desarrollado anteriormente dicha toxicidad tampoco es predecible (hepatitis alérgica medicamentosa) (8,12,28).

1.3.3.3. FACTORES DE RIESGO.

Es difícil establecer conclusiones definitivas sobre los factores de riesgo de HFAT debido a que las diferencias metodológicas entre los diferentes estudios no permite, en muchos casos, su comparación. A continuación se realiza un análisis de los factores de riesgo estudiados:

Edad mayor de 35 años: varios estudios sugieren que la edad incrementa el riesgo de HFAT. Sin embargo, dado que en varios de estos estudios no existe significación estadística, la edad no se considera un factor

de riesgo limitante a la hora de comenzar el tratamiento que incluya las tres drogas (10,12,28,46,47,50,86-88).

Se ha visto que la frecuencia de hepatotoxicidad varía entre el 22-33% en mayores de 35 años comparado con el 8-17% en los individuos más jóvenes (28,29).

Sexo: existen varios trabajos que ponen de manifiesto un aumento del riesgo de HFAT en las mujeres, aunque al igual que la edad no se considera un factor limitante del tratamiento (10,12,28,87,88).

Alcohol: en un número importante de trabajos se ha constatado que la ingesta excesiva de alcohol es un factor de riesgo de HFAT (12,28,33-35,47,56,82,86-88). Existen dos mecanismos patogénicos posibles. En primer lugar, la deplección del glutatión propia de los pacientes alcohólicos implicaría una menor capacidad detoxificadora de los metabolitos de la H. En segundo lugar, la capacidad inductora del alcohol del citocromo P-450 daría lugar a un aumento de la formación de hepatotoxinas derivadas del metabolismo de la H (Figura 1). Además, la R aumenta la inducción de los enzimas pertenecientes al citocromo P-450. Este desequilibrio entre la producción de tóxicos y su degradación inducida por el alcohol explicaría la predisposición de los pacientes alcohólicos a la HFAT (12,28,82,88).

Hepatitis B: existen varios trabajos que evalúan el riesgo de HFAT en individuos con hepatitis B. Dichos estudios no son directamente comparables ya que existen variaciones importantes en el diseño y factores que confieren confusión (89-92).

Wong *et al*, tras una ambiciosa investigación en el que excluyen a pacientes con hepatopatía de otro tipo, observaron que el 16% de los pacientes

con positividad para el HBsAg desarrollaron hepatotoxicidad comparado con el 4,7% en pacientes sin hepatitis B (90).

En otro estudio retrospectivo de casos y controles realizado en Corea, se observó una tendencia no significativa a desarrollar elevaciones de las transaminasas mayores de 5 veces los LSN en los casos con HBsAg positivos comparado con los controles (8% vs. 2%; $p = 0,05$) (91). Sin embargo, en el trabajo de Hwang *et al* el índice de HFAT en individuos con HBsAg fue similar al del grupo de pacientes sanos (29% vs. 26%) (91). Todos estos trabajos no estratificaron a los pacientes según la existencia de replicación activa del virus con HBeAg o ADN viral.

En otro estudio, se observaron diferencias en la frecuencia de HFAT en el grupo de pacientes con VHB (59% vs. 24%), pero la presencia del HBeAg no fue significativamente más frecuente en dicho grupo (92)

Aunque los datos de los que disponemos son limitados, indican que la infección por VHB puede ser un factor de riesgo de HFAT (89-92).

Hepatitis C: la relación entre el VHC y HFAT ha sido mucho menos estudiada. Ungo *et al* publicaron los resultados de un estudio en el que se incluyeron 134 pacientes, de los que 40 presentaban VHC (anti-VHC positivos y ARN-VHC positivos). Observaron que el riesgo de HFAT fue 5 veces superior ante la presencia de infección crónica por VHC (93).

En el estudio de Kwon *et al*, recientemente publicado, en el que se incluyeron 151 pacientes, de los que 54 presentaban anti-VHC positivo, se encontró un índice de HFAT (transaminasas por encima de 3 veces los LSN) del 41% en comparación con el 20% del grupo control ($p = 0,005$) (94).

Ambos estudios ponen de manifiesto que la infección por VHC es un factor de riesgo de HFAT, pero no limitante a la hora de instaurar el tratamiento con las 3 drogas siempre y cuando se realice una estricta monitorización de la función hepática (93,94).

Fenotipo acetilador: la relación entre el riesgo de HFAT y el fenotipo acetilador es un aspecto muy discutido desde hace décadas. Mitchel *et al* formularon la hipótesis de que los acetiladores rápidos podrían ser más vulnerables debido a que la producción de hepatotoxinas sería mayor dada la mayor actividad del NAT2 (50). Sin embargo, el depósito de acetil-hidrazina (Figura 1) también depende de una nueva acetilación por el mismo NAT2 para formar el metabolito no hepatotóxico diacetilhidrazina (12,18,50,88). Así pues varios estudios han determinado que los acetiladores lentos son más vulnerables a HFAT que los rápidos (39,45,46). Sin embargo, no siempre se ha evidenciado un aumento del riesgo de HFAT en acetiladores lentos (38).

Es difícil interpretar los resultados debido a que casi todos los estudios pueden estar influenciados por muchos factores de confusión como la edad, el sexo, la dieta, el consumo de alcohol, la hepatopatía, comorbilidad y toma de otros fármacos (12,50). Además, la existencia de diferentes métodos de determinación del fenotipo así como de puntos de corte, hace que la comparación entre los diferentes estudios sea complicada (12,50). Una posible solución a estos problemas sería determinar el estatus acetilador mediante genotipificación del NAT2.

Factores genéticos: varios estudios han relacionado la susceptibilidad de HFAT con diferentes polimorfismos genéticos de las enzimas NAT2, CYP2E1, GST y Manganese superoxido reductasa (MnSOD), polimorfismos

que determinan un fenotipo metabólico diferente, lo cual se relaciona directamente con el riesgo de hepatotoxicidad (12,38,39,43-50). Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce la toxicidad y el modo en que estos factores influyen en su desarrollo es poco conocido.

La ausencia o presencia de ciertos alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) clase II se ha relacionado con un mayor riesgo inmunogenético de daño hepático secundario a FAT. Sharma *et al* estudiaron los HLA clase II en una cohorte de población india a tratamiento con FAT encontrando un aumento del riesgo de HFAT ante la ausencia de *HLA-DQA1*0102* y la presencia de *HLA-DQB1*0201* (86).

Por lo tanto, parecen existir factores genéticos que podrían modular el riesgo de HFAT por lo que su estudio constituye una aproximación de la aplicación de la farmacogenética y farmacogenómica en la prevención futura de HFAT (50). Por este motivo, el último consenso oficial de la ATS sobre HFAT señala el estudio de los factores genéticos implicados en HFAT como un objetivo prioritario (12).

I.3.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.

Al igual que ocurre con otros agentes hepatotóxicos, el daño hepático inducido los FAT no posee características clínicas, analíticas o anatomopatológicas específicas que permitan un diagnóstico de certeza, de tal modo que, dicho proceso se basa en la evidencia circunstancial de la exposición a la hepatotoxina potencial y la exclusión de otras causas alternativas de daño hepático (21-25,28). Antes de hacer el diagnóstico de hepatitis inducida por un determinado fármaco, es obligado efectuar una

minuciosa anamnesis que tenga en cuenta todos los productos de prescripción o libre dispensación (incluyendo analgésicos, como el paracetamol, o productos de herboristería), así como el uso de drogas de abuso, consumidos en los meses previos.

Debido a la potencial capacidad lesiva hepática de una amplia gama de agentes terapéuticos y la frecuente prescripción simultánea de varios medicamentos, es importante identificar al más probablemente involucrado. Esta aproximación puede hacerse prestando especial atención al fármaco tomado más recientemente y mediante el conocimiento del tipo de lesión hepática del paciente y su posible relación con la inducida por alguno de los agentes bajo sospecha.

Uno de los aspectos más importantes es la relación temporal entre la exposición al fármaco sospechoso y la hepatotoxicidad. Aunque el periodo de latencia entre el inicio del tratamiento y la aparición de la hepatitis es variable, normalmente dura entre 1 semana y 3 meses. Su presentación antes de los 7 días o después de los 3 meses es rara (21-25).

También es importante a la hora de determinar la causalidad conocer la evolución del cuadro tras la supresión del agente sospechoso. Al interrumpir el consumo del fármaco responsable, debe de producirse una rápida mejoría clínica y analítica. Un descenso de, al menos, un 50% en los niveles séricos de ALT, durante los primeros 30 días (sobre todo si ocurre durante la primera semana) tras la supresión, constituye una evidencia de peso a favor del fármaco retirado (21-25).

El efecto de la reexposición al agente sospechoso es un instrumento de evaluación de la causalidad concluyente, pero rara vez está justificado por

motivos éticos, ya que la reacción hepática puede ser de mayor gravedad que el episodio inicial (21-25).

Las manifestaciones clínicas de la hepatotoxicidad son inespecíficas y no constituyen una gran ayuda para el diagnóstico (21-25).

La biopsia hepática rara vez proporciona el diagnóstico directo de hepatotoxicidad y, por tanto, no se debe indicar rutinariamente con este propósito, especialmente si el papel causal del fármaco es evidente por criterios cronológicos. Tiene, en cambio, justificación practicarla si la etiología tóxica es dudosa y deben excluirse causas alternativas si el principio activo sospechoso no ha sido previamente imputado en reacciones hepatotóxicas y con fines pronósticos (23-25).

Se establece que la nomenclatura de las lesiones hepáticas tóxicas debería ser, en el caso de practicarse una biopsia, la de los hallazgos histológicos. En ausencia de esta información y basándose en criterios de laboratorio, se clasificarían en (95):

- a) Hepatocelular: incremento aislado de $ALT > 2 \text{ LSN}$ o $Rt > 5$ siendo Rt el cociente ALT/FA expresada en múltiplos del LSN.
- b) Colestásica: incremento aislado de $FA > 2 \text{ LSN}$ o $Rt < 2$.
- c) Mixta: $ALT > 2 \text{ LSN}$, incremento de FA y $Rt > 2$, pero < 5 .

En un intento de estimar, cuantitativamente, la probabilidad de que un agente terapéutico esté involucrado en un cuadro hepático, se han desarrollado varios instrumentos o algoritmos diagnósticos, que puntúan positivamente, negativamente o de forma neutra, según un baremo predeterminado, factores tales como la ausencia o la presencia de factores de confusión, la relación temporal entre el consumo del fármaco y la aparición de la hepatopatía, el

efecto de la supresión del tratamiento sobre el perfil hepático, el efecto de la readministración del agente, la presencia de signos de hipersensibilidad y el conocimiento de la reacción en la literatura (96). La puntuación final obtenida clasifica el caso en altamente probable o definitivo, probable, posible, improbable o excluido. La escala del Council of International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) (Tabla 2) ha demostrado ser la más realista para la evaluación de la causalidad en un análisis comparativo (97-99). Según la puntuación obtenida, la hepatotoxicidad se clasificaría: < 0, ausencia de relación con la droga excluida; entre 1 y 2, poco probable; entre 3 y 5, posible; entre 6 y 8, probable; y, > de 8, altamente probable (97-99). Sin embargo, desde el punto de vista práctico, la aplicación de estas escalas no siempre es posible. Otra de sus limitaciones, siendo un tema de amplia controversia en la literatura médica, es el diagnóstico de la hepatotoxicidad inducida por un determinado fármaco en pacientes que presentan una enfermedad hepática preexistente con o sin alteraciones en las pruebas de función hepática previas al inicio de la administración del fármaco en cuestión (21). Es difícil saber si las reacciones hepáticas de origen idiosincrásico se producen con una mayor frecuencia y gravedad en estos pacientes por una mayor capacidad de que los metabolitos tóxicos generen una lesión sobre el hígado o por la alteración que en estos casos existe en los mecanismos de reparación del daño hepático, o por lo que parece más probable, por ambos (9,21).

Tabla 2. Causalidad de reacciones hepáticas a drogas. Escala CIOMS¹

Criterios	Interpretación	Puntuación
Tiempo desde el inicio de tratamiento	Altamente sugestivo	+3
	Sugestivo	+2
	Compatible	+2
	Inconcluyente	0
Curso de la reacción	Altamente sugestivo	+3
	Sugestivo	+2
	Compatible	+1
	En contra del fármaco	-2
	Inconcluyente	0
Factores de riesgo para la toxicidad	Presentes	+1 a +2 ²
	Ausentes	0
Otras causas no farmacológicas posibles³	Excluídas	+2
	Posibles o no investigadas	+1 a -2
	Probable	-3
Información previa del fármaco	No conocida	0
	Publicada pero no citada en los prospectos del producto	+2
	Citada en los prospectos del producto	+3
Respuesta a la re-administración	Positiva	+3
	Compatible	+1
	Negativa	-2
	No realizada	0

¹Adaptado de las referencias 97-99

²Un punto adicional por cada riesgo conocido de hepatotoxicidad (máximo valor +2)

³La suma de los criterios 4 y 5 no debe ser < de -4

El diagnóstico precoz de la lesión hepática inducida por los fármacos en estos casos podría minimizar la gravedad de las mismas. La aparición de síntomas sugestivos de hepatotoxicidad del fármaco o el empeoramiento de las alteraciones preexistentes de las enzimas hepáticas suelen ser los datos que nos hagan sospecharlo. La aparición de ictericia es uno de los factores que suele empeorar el pronóstico.

En general, en los pacientes sin hepatopatía previa las elevaciones de las enzimas hepáticas entre 3 y 5 veces los LSN en ausencia de síntomas, nos deben poner en alerta, siendo recomendable que incrementemos el número de controles clínicos y analíticos o retiremos el fármaco en cuestión (21-25,99). Estas cifras se han considerado de forma arbitraria y basándose en opiniones de expertos (9-12,22).

Existe consenso (9-12) para considerar que en pacientes que reciben H es necesario suspender la administración del fármaco cuando se produzcan elevaciones de las transaminasas por encima de 3 veces los LSN en pacientes con síntomas sugestivos de hepatitis o elevaciones superiores a 5 veces los LSN si están asintomáticos. En el último documento de consenso de la ATS, los CDC y la Infectious Disease Society of America (IDSA) sobre el tratamiento de la TB (10), se describe una clasificación del nivel de gravedad de la hepatotoxicidad en función de la cifra máxima de AST alcanzada, siendo una adaptación de la clasificación de efectos adversos hepáticos propuesta por la OMS (22). Así se define la hepatotoxicidad leve por H ante aumentos de la ALT o AST entre 3 y 5 veces los LSN (120-200 UI/L), lo que corresponde aproximadamente a las reacciones grado 2 de la OMS; hepatotoxicidad moderada ante elevaciones de la AST o ALT entre 5 y 10 veces los LSN (201-

400 UI/L) que se corresponde a las reacciones grado 3 de la OMS; y hepatotoxicidad grave ante elevaciones superiores a 10 veces los LSN (> 400 UI/L), que se corresponde con el grado 4 de la OMS.

Según las recomendaciones actuales (9-12), en ausencia de síntomas, no es necesario suspender la H ante hepatitis leves, aunque si debe aumentarse el número de controles clínicos y bioquímicos. Si estas cifras superan 5 veces los LSN, aunque no tengan síntomas, debe detenerse la administración del tratamiento, y realizar determinaciones seriadas hasta la normalización o regreso de las transaminasas a sus cifras basales. Además deben descartarse otras causas de hepatitis mediante una adecuada historia clínica sobre la ingesta de otros posibles hepatotóxicos y la realización de serología para las hepatitis víricas, si previamente eran negativas, o de las técnicas de imagen necesarias si se sospecharan otras enfermedades como la patología biliar.

En general, no se considera que sea necesario la realización de pruebas de función hepática basales ni un seguimiento seriado con determinaciones analíticas de las transaminasas a todos los pacientes que van a iniciar TITL con H (9-12). Sí indican que es fundamental advertir a todos los pacientes de la potencial hepatotoxicidad del fármaco y de los posibles signos y síntomas de la misma, para que suspendan inmediatamente la H en caso de su aparición y sean consultados para comprobar o descartar este efecto adverso mediante la realización de una analítica sanguínea. Es conveniente que los resultados de estas pruebas se reciban con la mayor premura (12).

En pacientes con hepatopatías previas, alcohólicos, ancianos, usuarios de drogas, mujeres gestantes o en el posparto, pacientes que reciben de forma

concomitante otros fármacos o con enfermedades crónicas como la diabetes o insuficiencia renal crónica, sí es aconsejable la realización de determinaciones basales de las pruebas de función hepática y de controles analíticos periódicos (12). La realización sistemática de controles bioquímicos en pacientes que reciben H puede hacer que se sobrestime la verdadera incidencia de la hepatotoxicidad al incluir pacientes asintomáticos con elevaciones transitorias de las transaminasas (36). Hasta el 20% de los pacientes que reciben tratamiento con H experimentan elevaciones transitorias y asintomáticas de las transaminasas (12). Por otra parte, el diagnóstico precoz de la hepatotoxicidad inducida por fármacos, sobre todo en pacientes con patología hepática subyacente, podría evitar la aparición de los casos más graves o fatales. Sin embargo, la conveniencia de realizar controles analíticos rutinarios sigue estando muy controvertida en la actualidad.

Sí existe consenso en que este tipo de seguimiento con controles analíticos seriados no debe nunca sustituir a los controles clínicos que deben ser realizados siempre por personal experimentado y como mínimo mensualmente.

No se han definido claramente cuales son los valores basales límites de las transaminasas que se consideran seguros para iniciar el TITL con H. En varios estudios revisados la H se desaconsejaba cuando la ALT o AST superaban 3 veces los LSN (55,100,101). Sin embargo, en el tratamiento de la enfermedad tuberculosa, según el último documento oficial de la ATS sobre HFAT, ante la presencia de transaminasas basales superiores a 3 veces los LSN se debe evitar la administración de Z y optar por el regimen alternativo de H en combinación con R durante 9 meses (12). Dicho documento también

recomienda disponer, antes de comenzar el tratamiento, de los niveles basales de transaminasas séricas, bilirrubina, FA, creatinina, recuento total de plaquetas y parámetros de coagulación sanguínea. Al igual que para el TITL no existe consenso acerca de la conveniencia de realizar controles analíticos de las pruebas de función hepática en los pacientes sin factores de riesgo de HFAT. En pacientes con hepatopatía previa conocida, niveles de transaminasas basales elevados, consumidores excesivos de alcohol o de otras drogas hepatotóxicas, VIH positivos y con antecedentes de HFAT previa, existe acuerdo sobre la conveniencia de realizar una monitorización analítica, además de la clínica, que incluya parámetros de función hepática (12).

I.4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS: GENERALIDADES.

El ADN es una estructura variable, tanto entre individuos de especies diferentes como entre individuos de una misma especie. Esta diversidad es responsable de fenómenos biológicos de tanta trascendencia como la evolución de las especies y, dentro de cada especie, de la presencia de características diferenciales en cada individuo. La diversidad o variabilidad genética se debe a variaciones en la secuencia del genoma; por tanto, en un sentido amplio el concepto de diversidad se hace sinónimo de polimorfismo (en su significado literal, “muchas formas”) (102).

Hoy en día se define polimorfismo como la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado (102). Los alelos son variaciones de la secuencia de ADN presente en un locus o posición definida en un cromosoma; consecuentemente, en una célula diploide cada locus autonómico está ocupado por dos alelos, uno de origen paterno y otro materno, situados en sendos cromosomas homólogos. El grado de polimorfismo de una población viene determinado por el número de alelos distintos existentes para un locus concreto y se refleja en el grado de heterocigosis, o proporción de individuos heterocigóticos que forman parte de una población (102).

La distinción entre el uso de los términos mutación y polimorfismo no es clara ni unánime, pero en general se asocia el primero con situaciones excepcionales, en especial patológicas, mientras que se habla de polimorfismo cuando la presencia de la variación genética es común en la población y, por tanto, estable y nada o poco perjudicial. Por convenio, se dice que un locus es polimórfico cuando la variabilidad afecta a más del 1% de la población. El

polimorfismo puede tener distinta trascendencia desde el punto de vista funcional, dependiendo de si afecta a regiones codificantes, reguladoras o no codificantes del genoma y también del modo como afecte al mensaje genético de estas últimas. En los polimorfismos genéticos localizados en una secuencia codificante puede existir una alteración del fenotipo cuando la secuencia del gen modifica la secuencia de la proteína. La alteración puede modificar las características bioquímicas, morfológicas e incluso funcionales de la célula, pudiendo llegar a originar procesos patológicos, en función de la gravedad de dicho efecto fenotípico. Así pues se pueden distinguir variaciones fenotípicas que no influyen en la susceptibilidad a enfermedades, variaciones fenotípicas que influyen de forma leve o mínima en la predisposición a ciertos procesos patológicos y variaciones fenotípicas que desempeñan un papel importante en la aparición de una patología (102).

El estudio de los polimorfismos que tienen una contribución mínima o leve a la susceptibilidad frente a ciertos procesos patológicos posee interés médico, especialmente en la prevención de enfermedades. Los polimorfismos que desempeñan un papel directo en la aparición de un fenotipo patológico son, evidentemente, aplicables para el diagnóstico, así como para el estudio de los mecanismos moleculares de enfermedad (102).

I.5. POLIMORFISMOS DEL *N*-ACETIL TRANSFERASA 2.

I.5.1. INTRODUCCIÓN.

La observación de diferentes velocidades de acetilación tanto de la H como de otros fármacos como la sulfametazina puso de manifiesto la existencia de varios fenotipos acetiladores. Según la velocidad de acetilación de dichas

drogas se clasificó a los individuos en acetiladores rápidos, intermedios y lentos (103). Posteriormente, se observó que el fenotipo acetilador estaba determinado genéticamente, y que existían diferencias interétnicas, de modo que aproximadamente la mitad de los pacientes caucásicos eliminaban lentamente la H debido a reducción de la tasa de acetilación en el hígado (104-106). Posteriores estudios *in vivo* e *in vitro* concluyeron que la metabolización de una amplia variedad de arilaminas, hidracinas y xenobióticos se encontraba afectada por el mismo defecto genético (107).

I.5.2. ENZIMAS N-ACETILTRANSFERASA.

La reacción enzimática de *N*-acetilación es llevada a cabo por la enzima citosólica Arilamina *N*-acetiltransferasa (NAT; EC 2.3.1.5) mediante la transferencia de acetato procedente del Acetil Coenzima A a aminas aromáticas e hidracinas (107)

Los sustratos de la reacción de *N*-acetilación pueden ser polimórficos, como la H, cuando la velocidad de acetilación varía según el genotipo y monomórficos, como el ácido *P*-aminosalicílico, cuando no existen variaciones en la velocidad de acetilación. Este hecho tiene su base bioquímica en la existencia de dos tipos de *N*-acetiltransferasas; la que metaboliza sustratos de modo polimórfico denominada NAT2 y aquella que metaboliza sustratos de modo monomórfico denominada NAT1 (107).

Los polimorfismos del NAT2 son muy importantes en los campos de la farmacología clínica y la toxicología debido a su importante papel en la activación y/o desactivación de una gran variedad de aminas aromáticas y fármacos hidracinas muy utilizadas en la práctica clínica (107-110) que se han

relacionado con la génesis de tumores en roedores (109). Existen trabajos que han localizado mutaciones dentro de la región catalítica de la enzima que es responsable de la transferencia de acetato entre el AcetilCoA al sustrato metabolizado (110). La acetilación no sólo es la vía de detoxificación de ciertos compuestos potencialmente cancerígenos, sino que en ocasiones, determinadas sustancias procancerígenas pueden ser activadas mediante O-acetilación produciéndose acetoxiarilaminas. Éstas se rompen espontáneamente originando iones aril-nitrenios, altamente reactivos y responsables de mutaciones en el ADN (108-111).

También se han encontrado numerosas variantes alélicas del *NAT1* algunas de las cuales dan lugar a un fenotipo *NAT1* lento (106).

La actividad del *NAT2* se desarrolla fundamentalmente en el hígado y tracto gastrointestinal, sin embargo la actividad del *NAT1* se ha detectado en muchos tejidos extrahepáticos. Dado que tanto el *NAT1* como el *NAT2* catalizan la activación metabólica (vía O-acetilación) de carcinógenos, sus polimorfismos poseen una influencia en el riesgo de cáncer relacionado con la exposición a estos carcinógenos (111-113). La activación metabólica de la mayoría de las aminas heterocíclicas carcinógenas en humanos se debe más a la acción catalítica del *NAT2* que del *NAT1*, aunque se ha de tener en cuenta que la expresión tejido-específica es también de importancia para realizar una correcta evaluación de la influencia de los polimorfismos del *NAT1* y del *NAT2* en el riesgo de cáncer (114-115).

I.5.3. GENOTIPO ACETILADOR.

Los genes que codifican las enzimas NAT1 y NAT2 están localizados en el cromosoma 8p22 (114,115).

Existen 3 genes distintos de *N-acetiltransferasas* en humanos: *NAT1*, *NAT2* Y *NATP* (108,114,115). El *NATP* es un pseudogen que contiene mutaciones que impiden a su ARN mensajero traducirse en una proteína funcional.

En el año 1995 se publicó un consenso sobre la nomenclatura del gen *NAT* (116) y, posteriormente en el año 1998 se creó el Comité Internacional de Nomenclatura del *NAT* con el fin de ir actualizando la nomenclatura de sus variantes génicas. Según la última actualización de mayo del 2007 (web-site accesible por Internet en la dirección www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html) se han identificado 36 variantes alélicas del *NAT2*, cada una de las cuales representa una combinación de 1 a 4 sustituciones de nucleótidos (Tabla 3). Algunas variantes alélicas presentan sustituciones de nucleótidos que son muy poco frecuentes (frecuencias entre el 0,03 y 0,5%) por lo que no constituyen un polimorfismo genético (frecuencia mayor al 1% según su definición).

Dentro de las sustituciones de nucleótidos que se han identificado en el exon codificante del *NAT2*, cuatro (T111C, C282T, C481T y G590A) son silentes, es decir, no determinan ningún cambio en la proteína. El alelo *NAT2**4 no presenta ninguna de estas sustituciones de nucleótidos por lo que se define como normal o “wild-type” y se corresponde a un fenotipo acetilador rápido. El hecho de que sea el alelo “wild-type” no quiere decir que sea el más frecuente. De hecho, su frecuencia varía en función de la población estudiada. Los alelos

del *NAT2* que contienen los cambios de nucleótidos G191A, T341C, A434C, G590A y/o G857A se asocian con un fenotipo acetilador lento (117).

La frecuencia de estas sustituciones en las diferentes poblaciones es variable por lo que existen diferencias interétnicas en la capacidad acetiladora (118,119).

Los alelos más frecuentes responsables de los fenotipos acetiladores lentos son el *5, *6 y *7. El alelo *5 contiene siempre el cambio T341C. Se subdivide en 10 variantes (A, B, C, D, E, F, G, H y I) según su combinación con otras sustituciones de nucleótidos (Tabla 3). La sustitución silente C481T se puede observar en los alelos *5A, *5B, *5F, *5G, *5H y *5I. El alelo *6 se caracteriza por presentar la sustitución G590A, y según su combinación con otras sustituciones de nucleótidos se subdivide en 5 variantes (A, B, C, D y E) (Tabla 3). El alelo *7 presenta la sustitución G857A en sus dos variantes conocidas (A y B) (Tabla 3). A pesar de tener en cuenta las diferencias interétnicas, la mayoría de los fenotipos acetiladores lentos se corresponden con las variantes alélicas *5B, *6A y *7B. Por este motivo, varias investigaciones consideran suficiente el estudio de las sustituciones de nucleótidos C481T, G590A y G857A correspondientes a la mayor parte de las variantes alélicas *5, *6 y *7 (39,45,46,116,117,118). De hecho, en un principio, el alelo “wild-type” fue definido como la ausencia de las sustituciones C481T, G590A y G857A. Sin embargo, tal y como apuntan Cascorbi *et al* si sólo se estudian dichas variantes varios alelos lentos pueden ser incorrectamente clasificados como “wild-type” (119).

Tabla 3: Alelos NAT2.

Alelos	Cambio de nucleótido(s)	Cambio de aminoácido(s)	Referencias
NAT2*4	Ninguno	Ninguno	106,120-124
NAT2*5A	T341C	I114T	118,121,124,125
	C481T		
NAT2*5B	T341C	I114T	118,120,126
	C481T	K268R	
	A803G		
NAT2*5C	T341C	I114T	118,119,124,125
	A803G	K268R	
NAT2*5D	T341C	I114T	127-130
NAT2*5E	T341C	I114T	127
	G590A	R197Q	
NAT2*5F	T341C	I114T	131
	C481T	K268R	
	C759T		
	A803G		
NAT2*5G	C282T	I114T	132
	T341C	K268R	
	C481T		
	A803G		
NAT2*5H	T341C	I114T	132
	C481T	K268R	
	A803G	S287 Frameshift	
	859Del		
NAT2*5I	T341C	I114T	133
	A411T	L137F	
	C481T	K268R	
	A803G		
NAT2*5J	C282T	I114T	134
	T341C	R197Q	
	G590A		
NAT2*6A	C282T	R197Q	106, 118-121
	G590A		
NAT2*6B	G590A	R197Q	118,128,129
NAT2*6C	C282T	R197Q	128,129
	G590A	K268R	
	A803G		
NAT2*6D	T111C	R197Q	130
	C282T		
	G590A		
NAT2*6E	C481T	R197Q	135

	G590A		
NAT2*7A	G857A	G286E	118,121,123
NAT2*7B	C282T	G286E	106,124
	G857A		
NAT2*10	G499A	E167K	136
NAT2*11A	C481T	Ninguno	136,137
NAT2*11B	C481T	S287 Frameshift	132
	859Del		
NAT2*12A	A803G	K268R	118,138
NAT2*12B	C282T	K268R	118, 129
	A803G		
NAT2*12C	C481T	K268R	125,128,129
	A803G		
NAT2*12D	G364A	D122N	133
	A803G	K268R	
NAT2*13	C282T	Ninguno	118,119,127,139
NAT2*14A	G191A	R64Q	125,140
NAT2*14B	G191A	R64Q	140,141
	C282T		
NAT2*14C	G191A	R64Q	127-129
	T341C	I114T	
	C481T	K268R	
	A803G		
NAT2*14D	G191A	R64Q	127,129
	C282T	R197Q	
	G590A		
NAT2*14E	G191A	R64Q	127
	A803G	K268R	
NAT2*14F	G191A	R64Q	129
	T341C	I114T	
	A803G	K268R	
NAT2*14G	G191A	R64Q	130
	C282T	K268R	
	A803G		
NAT2*17	A434C	Q145P	142
NAT2*18	A845C	K282T	142
NAT2*19	C190T	R64W	143-145

(Revisado en Mayo de 2007, adaptado de
www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html)

En su estudio, realizado en población alemana, la combinación de éstos con otros alelos *NAT2* también lentos comprenden el 8,5% del total de los genotipos por lo que si sólo se hubiesen realizado las determinaciones de las sustituciones C481T, G590A y G857A la frecuencia del fenotipo acetilador lento se encontraría claramente infravalorada (119). De estos datos podemos deducir que la diferente frecuencia y distribución interracial de los genotipos lentos del *NAT2* debe ser considerada a la hora de determinar los genotipos lentos de forma coste-efectiva.

I.5.4. RELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO.

Las sustituciones de nucleótidos en el gen del *NAT2* producen una serie de cambios de cambios en la enzima *NAT2*. Dichos cambios alteran la función de la enzima reduciendo su actividad catalítica, la afinidad por el sustrato y/o la estabilidad de la enzima (108,110,123,133,146-149). Los alelos *NAT2* *5, *6, *7, *14 y *17 se asocian a una disminución de la actividad acetiladora del enzima de grado variable según la combinación alélica. Sin embargo, los alelos *12 y *13 catalizan la reacción de *N*-acetilación a unos niveles comparables con los acetiladores rápidos *NAT2**4 (Figura 2). Aunque en el trabajo de Cascorbi *et al* se observó que el alelo *NAT2* *13 se asociaba con un fenotipo acetilador lento *in vivo* (117) posteriormente varios trabajos demostraron que se asocia a un fenotipo acetilador rápido (146,150,151). Se han observado diferencias en la estabilidad proteica de forma que las enzimas *NAT2* 6, *NAT2* 7, *NAT2* 14 y *NAT2* 18 son menos estables que otros (108,122,133,145,146) y varios estudios han revelado una disminución de la expresión de la enzima *NAT2* asociada a sus variantes alélicas (108,115,133,142,144).

Debido a que las variantes alélicas del *NAT2* pueden dar lugar a una reducción de la actividad *N*-acetiltransferasa por múltiples mecanismos, la determinación del fenotipo acetilador es compleja y depende básicamente de la sensibilidad y especificidad del método. Incluso existen estudios que han encontrado diferencias fenotípicas dentro del grupo de acetiladores lentos (108,135,150).

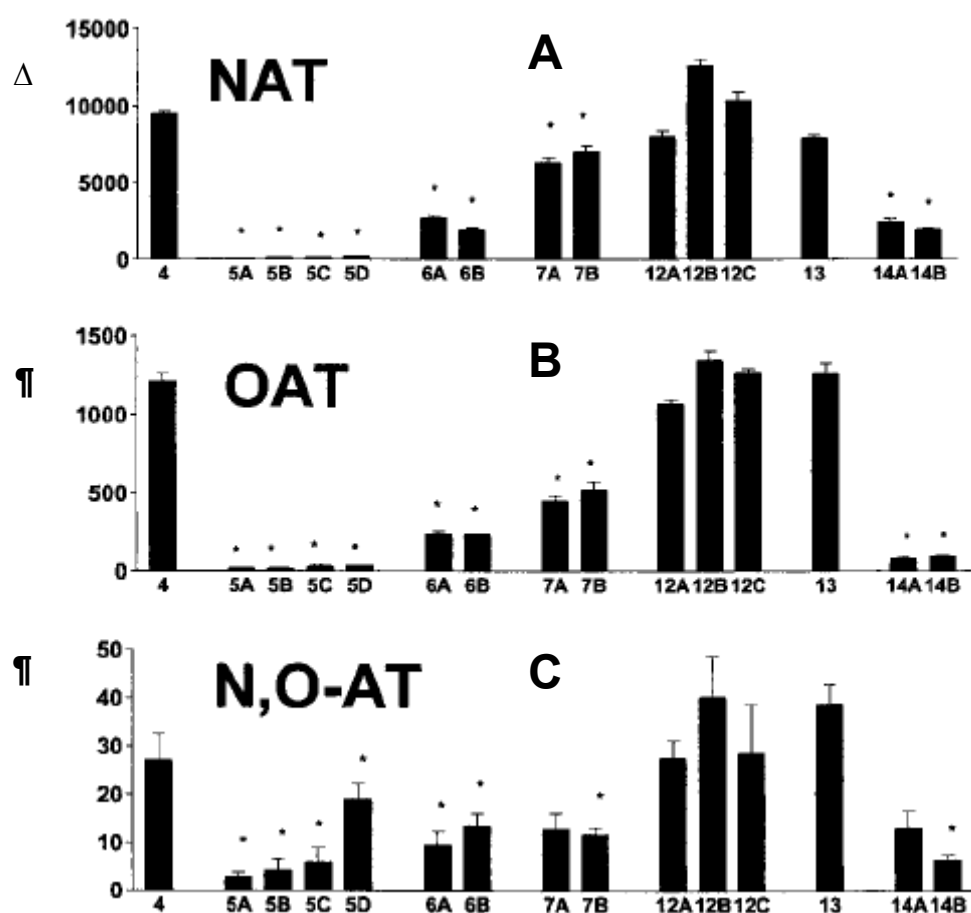


Figura 2. Capacidad relativa de las isoenzimas *NAT2* de catalizar la *N*-acetilación de 2-aminofluorano (A), la, *O*-acetilación de *N*-hidroxi-*N*-acetil-2-aminofluorano (B) y la *N,O*-acetilación de *N*-hidroxi-*N*-acetil-2-aminofluorano (C). Los niveles de acetiltransferasa para cada enzima fueron *N*-acetilación > *O*-acetilación > *N,O*-acetilación, * significativamente inferiores a *NAT2* 4 ($p < 0,05$). Δ La actividad *NAT* se expresó como pmol/min/unidad proteína; Π las actividades *OAT* y *N,O-AT* se expresaron en pmol/min/mg ADN/unidad proteína. Adaptado de referencia 110.

Es conocido que el fenotipo acetilador está influenciado por la dieta, las enfermedades y la toma de fármacos. Así pues, en función del fármaco y el método analítico empleados, los fenotipos acetiladores en muchas ocasiones no son claramente separables en diferentes tipos ya que se encuentran influenciados por una enorme variedad de factores genéticos y ambientales, incluyendo la gran diversidad de genotipos de *NAT2* en las diferentes poblaciones (108). La sustancia más utilizada para determinar el fenotipo acetilador y con una mejor correlación genotipo-fenotipo es la cafeína (108,135). El principal inconveniente de la cafeína es que para determinar el fenotipo acetilador del *NAT2* es necesario cuantificar metabolitos secundarios de su metabolismo, que provienen de vías metabólicas en las que intervienen intermediarios muchas veces desconocidos. Las variaciones genéticas y la influencia ambiental afectan a muchos sistemas enzimáticos (p.ej. citocromo P-450 o xantina oxidasa) que pueden dar lugar a variaciones en los niveles de los metabolitos usados en el análisis fenotípico (108).

1.5.5. VARIACIONES INTERÉTNICAS DEL POLIMORFISMO ACETILADOR.

Varias publicaciones han demostrado que los alelos del *NAT2* no se distribuyen de forma aleatoria en las diferentes poblaciones sino que siguen diversos patrones de distribución racial/geográfica (152). Sin embargo, los estudios disponibles no son los suficientemente amplios y precisos para definir la frecuencia verdadera de dichos alelos en población sana (control). En la mayoría de los estudios en los que se han observado diferencias interraciales, la población a estudio ha sido dividida en tres grupos: caucásicos, asiáticos y africanos (en dicho grupo se incluyen los afro-americanos) (152). Los primeros

datos reflejan que entre un 50% y un 70% de los caucásicos y el 75% de los africanos son acetiladores lentos frente a un 10% en asiáticos (117,122,129,139,152,153). En españoles caucásicos, Agúndez *et al* encontraron que el 53% de la población sana estudiada presentaba un genotipo acetilador lento. Los alelos predominantes fueron el 5B* (32,9%) y el 6A* (24,9%) (139). Estos resultados son similares a otros procedentes de estudios en caucásicos. Según datos combinados de 21 trabajos de un total de 3.846 caucásicos la frecuencia de genotipos lentos (combinación de los alelos *5, *6 y *7) es del 57,4% (152). Abe *et al* observaron un mayor porcentaje del alelo “wild-type” en población japonesa y una menor frecuencia del alelo NAT2*5 que es el predominante en la población caucásica (126). Otras poblaciones como los hispanos centroamericanos tienen valores intermedios entre los caucásicos y orientales (154).

Los datos procedentes de todas estas investigaciones reflejan variaciones interétnicas del fenotipo acetilador. Sin embargo, para definir de forma verdadera su frecuencia en población control, son necesarios estudios más amplios y más precisos a la hora de definir la población a estudio según su etnia o área geográfica, que incluyan la determinación de todos los polimorfismos del NAT2 mediante métodos bien estandarizados.

I.5.6. ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO NAT2 CON DIFERENTES PATOLOGÍAS.

Los polimorfismos del NAT2 se han relacionado con el riesgo de desarrollar determinadas enfermedades y con una mayor susceptibilidad a sufrir los efectos adversos de fármacos metabolizados por *N*-acetilación. En

cuanto al mayor riesgo de enfermedades neoplásicas, en individuos acetiladores lentos, el metabolismo de sustancias cancerígenas del tipo de aminas aromáticas por el NAT2 podría determinar una mayor susceptibilidad a desarrollar determinados tipos de cánceres.

Varias clases de aminas aromáticas se encuentran presentes en el humo de los cigarrillos y en la dieta (108). El NAT2 puede activar determinadas sustancias procancerígenas mediante O-acetilación dando lugar a compuestos altamente reactivos y responsables de mutaciones del ADN (108). En estas reacciones también intervienen otros sistemas enzimáticos como el citocromo P-450. Dependiendo de los diferentes enzimas, los distintos productos químicos seguirán unas vías metabólicas u otras.

El papel del NAT2 y/o el del genotipo acetilador rápido vs. lento en la predisposición a cáncer es diferente en función del órgano en cuestión y debe de relacionarse con la expresión tejido-específica de las enzimas NAT2 (108).

Hasta la fecha disponemos de información sobre los polimorfismos del NAT2 y el riesgo de cáncer urinario, colorectal, mama, pulmón, cabeza y cuello y próstata (108).

El cáncer que parece estar más relacionado con el polimorfismo acetilador es el de vejiga. Varios trabajos han relacionado claramente el fenotipo y genotipo acetilador lento con el cáncer de vejiga siendo esta asociación todavía más evidente cuando los pacientes se encontraban ocupacionalmente expuestos a aminas cancerígenas (benzidina, B-naftilamina) (155). En un estudio reciente llevado a cabo en caucásicos españoles en el que se incluyeron 1.150 casos y 1.149 controles se observó un mayor riesgo de cáncer de vejiga en individuos con genotipo NAT2 lento comparado con los

individuos con genotipo rápido (156). Además, el riesgo fue mayor en los individuos fumadores, por lo que el genotipo lento del *NAT2* parece aumentar el riesgo de cáncer de vejiga particularmente en individuos fumadores (156).

Uno de los tipos de tumores más relacionados con el fenotipo acetilador rápido y la susceptibilidad a su desarrollo es el cáncer colorrectal (108). Se basa en el hecho de que ciertas sustancias presentes en determinados alimentos como ahumados y carnes demasiado cocinadas podrían ser convertidas en carcinógenas mediante la vía de *O*-acetilación, siendo esta vía tan predominante como la *N*-acetilación en la mucosa intestinal, al contrario de lo que ocurre en la mucosa vesical. Sin embargo, dos meta-análisis recientes en el que se analizan 20 y 17 estudios de casos y controles respectivamente, no muestran que los genotipos *NAT2* metabolizadores rápidos tengan ningún efecto específico en el riesgo de cáncer de colon (157,158). Estas diferencias podrían ser debidas a la no diferenciación en función de la localización del tumor. Agúndez *et al* estudiaron el genotipo acetilador de 120 pacientes afectados de cáncer de colon, observando que el genotipo acetilador rápido constituía un factor de riesgo para aquellos tumores localizados a nivel del colon sigmoide, pero no para aquellos cánceres de colon que presentaban una localización diferente (159).

Con respecto a otros tipos de cáncer relacionados con el polimorfismo *NAT2* (cabeza y cuello, mama y pulmón) se han realizado numerosos estudios con resultados contradictorios, aunque posteriores meta-análisis no demuestran la existencia de asociación entre el riesgo de dichos tumores y el genotipo *NAT2* (108,127,159-161).

En lo referente a otras enfermedades diferentes del cáncer, también se han realizado varios estudios que relacionan el genotipo *NAT2* con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (162), enfermedad de Parkinson (163) y artritis reumatoide (164) no encontrándose asociaciones u obteniendo resultados no confirmados con posterioridad. Además, en la mayoría de los casos las muestras de población utilizadas son muy pequeñas, impidiendo este hecho el obtener conclusiones definitivas. Por otra parte, también se han de tener en cuenta los diferentes tratamientos de las enfermedades estudiadas ya que podrían interferir con el fenotipo, es decir, que un determinado fenotipo entre los pacientes puede ser causa o efecto de la enfermedad. El lupus eritomatoso inducido por fármacos (fundamentalmente por procainamida e hidralazina), sí que se ha relacionado claramente con metabolizadores lentos (165). Una posible explicación sería que los acetiladores metabolizadores lentos tienen un mayor porcentaje de fármaco no acetilado, que sigue rutas metabólicas alternativas, interaccionando con macromoléculas celulares, dando lugar a sustancias que son reconocidas como autoantígenos, desencadenando una respuesta inmunitaria (165).

1.5.7. POLIMORFISMO *NAT2* Y RIESGO DE HEPATOTOXICIDAD POR FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS.

El acúmulo de metabolitos tóxicos derivados del metabolismo hepático de algunos fármacos está influenciado por el fenotipo metabólico de las principales enzimas implicadas en su metabolismo. Así pues, el riesgo de hepatitis tóxica secundaria a aquellos fármacos en cuya detoxificación hepática se encuentran implicadas las enzimas *NAT2* podría ser mayor en los

acetiladores lentos. A pesar de que son varios los fármacos en cuyo metabolismo intervienen las enzimas NAT2, solamente se ha documentado un mayor riesgo de hepatotoxicidad en individuos con genotipos NAT2 acetiladores lentos en el caso de los FAT.

Las concentraciones finales de los FAT dependen de la actividad de los enzimas implicados en su metabolismo. Por lo tanto, ciertos polimorfismos de los genes que codifican dichas enzimas pueden influir en su disposición. Tal y como se observa en la figura 1, la H es metabolizada a acetil-isoniacida a través de las enzimas NAT2 del hígado. Posteriormente, la acetil-isoniacida es hidrolizada a MAH, molécula que puede ser metabolizada a través de una nueva acetilación por las enzimas NAT2 dando lugar a metabolitos no hepatotóxicos, o por oxidación por las enzimas del CYP2E1, reacción que da lugar a metabolitos hepatotóxicos (24,28,46,50,88). Tal y como se detalló anteriormente, en los acetiladores rápidos la mayor parte de la H se degrada a acetil-isoniacida, mientras que en los lentos más de un tercio del fármaco es excretado por la orina sin modificaciones en su estructura. Además se ha observado que la relación entre acetil-isoniacida e isoniacida (A/H ratio) plasmática a las 2 horas de recibir 300 mg de H, es menor en los genotipos NAT2 lentos lo que sugiere que dichos genotipos influyen en la capacidad acetiladora de la H por el NAT2 (50).

La influencia de la velocidad de acetilación en la hepatotoxicidad por H es controvertida, de modo que en la literatura médica existen tanto estudios en los que se observa un aumento del riesgo de HFAT en los acetiladores lentos (12,39,43-46,50) como estudios en los que no se demuestra ninguna correlación entre la misma y el estatus acetilador (12,37,38,49,50). Cho *et al*

determinaron los polimorfismos del *NAT2* determinantes de un fenotipo acetilador lento en una cohorte de 132 pacientes coreanos a tratamiento con combinaciones de H, R y Z. Un total de 18 pacientes desarrollaron HFAT, definida como elevaciones de los niveles de AST mayores de 2 veces los LSN. La presencia de genotipos del *NAT2* lentos fue más frecuente en los casos que desarrollaron HFAT que en los controles ($p=0,005$) (45). Huang *et al* realizaron un estudio en población china en el que se determinó la influencia de los polimorfismos genéticos del *NAT2*, *5, *6 y *7 (desaparición de las dianas de restricción de *KpnI*, *TaqI* y *BamHI*) en homocigosis y heterocigosis entre ellos y el alelo *4 “wild-type”, en el riesgo de HFAT. Observaron que de 33 pacientes que desarrollaron HFAT, catorce (42,4%) poseían uno de estos genotipos (46). Dichos resultados se correlacionaron con los obtenidos en un segundo trabajo también en población china (47). Dos estudios llevados a cabo en población japonesa en los que se determinó de forma prospectiva la relación entre los genotipos del *NAT2* resultado de la combinación de los alelos anteriormente citados y el desarrollo de HFAT corroboran los mismos hallazgos (39,44). Recientemente, se ha observado también una relación significativa entre dichos polimorfismos y el riesgo de HFAT en población procedente de Turquía (43). Estos hallazgos sustentan la hipótesis de que la *N*-acetilación juega un papel importante en la patogénesis de HFAT. Hemos de reseñar que la posible influencia de dichos polimorfismos en el riesgo de HFAT se ha estudiado predominantemente en poblaciones asiáticas (coreanos, chinos, japoneses e indios) de modo que no existen estudios genéticos de riesgo de HFAT en caucásicos. Además, hay trabajos en los que no se ha evidenciado ningún incremento del riesgo de HFAT en acetiladores lentos (37,38,49). Los

diferentes resultados obtenidos podrían tener explicación en la heterogeneidad racial de la población estudiada, el pequeño tamaño muestral, las variaciones en la distribución genotípica del *NAT2* entre las diferentes poblaciones y en las diferencias en la dosificación de H entre los diferentes estudios así como la presencia de tratamiento concomitante con otros fármacos (50).

Se precisan estudios en las diferentes poblaciones que aclaren la influencia de las variantes alélicas del *NAT2* en el riesgo de HFAT. No existe ningún estudio de estas características en nuestra población caucásica.

I.6. POLIMORFISMOS DE LA *GLUTATION S-TRANSFERASA*.

I.6.1. INTRODUCCIÓN.

El GST (EC 2.5.1.18) es uno de los mayores grupos de enzimas detoxificantes. Constituye una familia de varias enzimas citosólicas y mitocondriales multifuncionales implicadas en la detoxificación y en la unión proteica intracelular. Así pues, cada GST tiene propiedades catalizadoras distintas: conjugación con glutation, peroxidación e isomerización (167).

Las enzimas GST conocidas hasta ahora pertenecen a 7 clases de acuerdo con su secuencia primaria de aminoácidos, llamadas α (alfa, A), μ (mu, M), π (pi, P), σ (sigma S), θ (teta, T), ω (omega, O) y ζ (zeta, Z) clases de GST (167). Las variantes alélicas que codifican la misma clase comparten entre el 75 y el 95% de la secuencia génica, y los miembros de diferentes clases entre el 25 y el 30% (167).

En humanos, se ha identificado su actividad en la mayor parte de los órganos: hígado, riñón, pulmón, intestino, piel, cerebro, glóbulos rojos, leucocitos, corazón y músculo esquelético (169). Dentro de cada órgano se pueden identificar diferentes isoenzimas debido a una expresión variable de algunas formas y a la completa ausencia de otras (169).

Dado su acción detoxificadora las enzimas GST citosólicas son de gran interés en farmacología, toxicología, carcinogénesis y enfermedades crónicas (170). A pesar de su importante papel en los procesos biológicos de detoxificación, dos de las isoenzimas más importantes, la enzima θ GSTT1 y la enzima μ GSTM1, presentes en elevadas concentraciones en el hígado, se encuentran genéticamente delecionadas en la población humana (170), y

aunque la presencia de polimorfismos de los principales enzimas metabolizadores de xenobióticos es común (152,170), la delección completa de dos de los genes más importantes en las reacciones metabólicas fase II es sorprendente y tiene consecuencias en los ámbitos de la toxicología, farmacología, carcinogénesis y las enfermedades crónicas (170).

I.6.1.1. *GSTM1*.

La clase μ incluye cinco genes, *GSTM1*, *M2*, *M3*, *M4* y *M5*. Se localizan en la región cromosómica 1p13.3 (167-170). El gen *GSTM1* es polimórfico y tiene 4 variantes alélicas *GSTM1* *A, *B, *C y *0. La variante *0 (alelo nulo) en homocigosis produce una pérdida de actividad de la enzima (genotipo *GSTM1**0 o *nulo*) (167-172). Por lo tanto, la variante *GSTM1**0 parece ser una delección del gen que codifica GSTM1A/B (173). El mapeo detallado del cluster *GSTM1* muestra que dicho gen está formado por 8 exones delimitados por 2 regiones idénticas de 4,2 Kb. El polimorfismo *GSTM1**0 se debe a un proceso de recombinación de ambas repeticiones (Figura 3) (170,172,173). El polimorfismo *GSTM1* nulo es frecuente en humanos, de forma que se encuentra presente en aproximadamente un 50% de la población, con un rango de 30-70% para los distintos grupos étnicos (170).

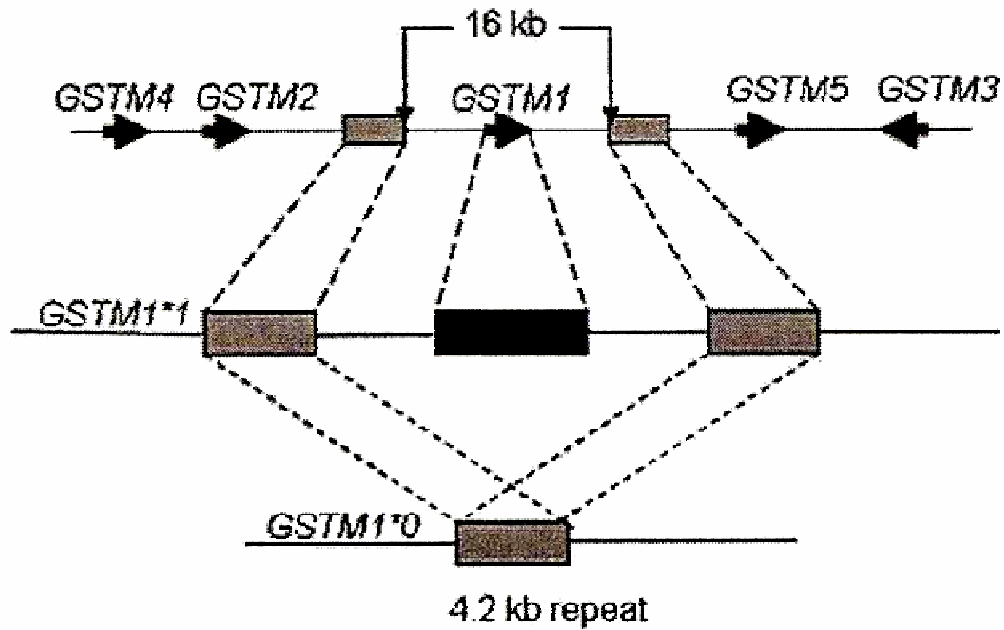


Figura 3: Estructura del gen *GSTM1*. La recombinación homóloga de ambas repeticiones conduce a una delección *GSTM1*. Adaptado de referencia 173.

I.6.1.2. *GSTT1*.

Dentro de la clase θ existe otro polimorfismo nulo en el locus *T1* (*GSTT1*0* o *nulo*) (174). El *GSTT1* constituye una parte del gen *GST*, localizado en la región cromosómica 22q11.2. Está constituido por 5 exones y se encuentra flanqueado por dos regiones HA3 y HA5 homólogas en más del 90% (170,173). De forma similar al *GSTM1*0*, el polimorfismo nulo *GSTT1*0* es consecuencia de una recombinación homóloga de ambas repeticiones HA3 y HA5 (Figura 4) que da como resultado una delección de 54 kb que contiene el gen *GSTT1* (173).

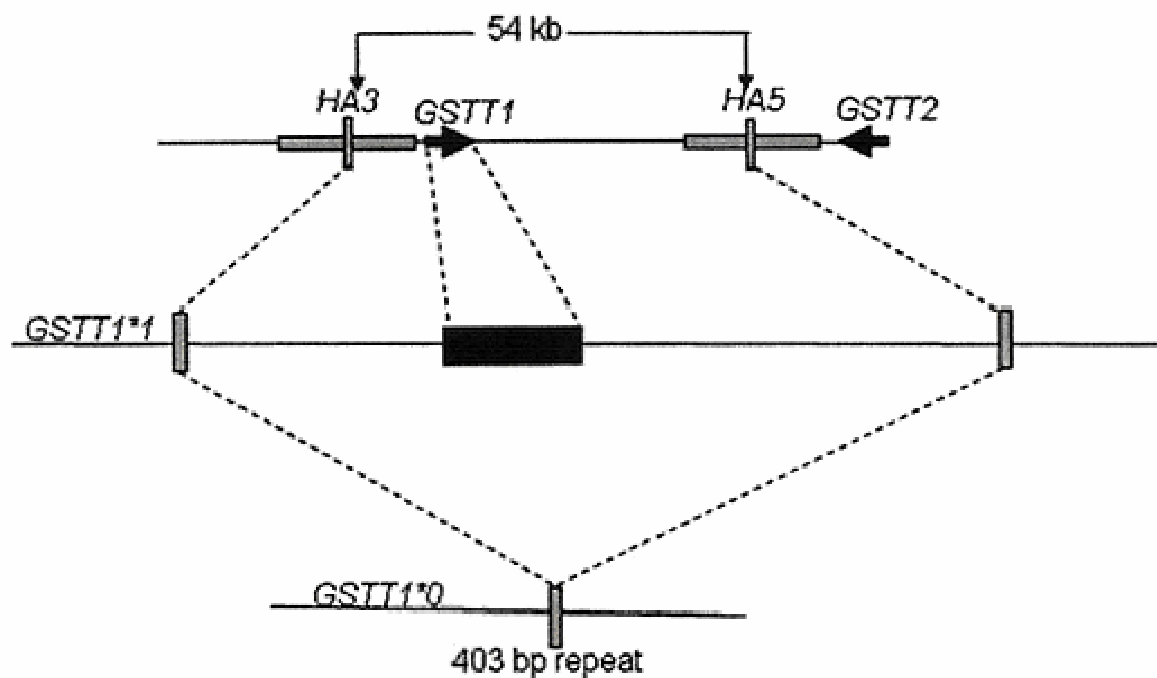


Figura 4: Estructura del gen *GSTT1*. La recombinación homóloga de ambas repeticiones HA3 y HA5 da lugar a la delección del *GSTT1*. Adaptado de referencia 173.

I.6.2. FUNCIÓN ENZIMÁTICA.

Como resultado de diversas reacciones de oxidación catalizadas por enzimas de fase I, muchos fármacos y xenobióticos son transformados en intermediarios de naturaleza electrofílica muy reactivos, que atacan rápidamente a moléculas nucleofílicas en las células, proteínas y ácidos nucleicos. Estas sustancias de naturaleza electrofílica también pueden proceder de procesos endógenos que producen radicales de oxígeno.

Uno de los mecanismos de biotransformación de estos metabolitos generados en la fase I es su unión covalente a moléculas endógenas de la célula tales como ácido glucurónico, glutatión, sulfato y aminoácidos generando conjugados (reacciones de fase II).

Dentro de los sistemas de detoxificación existentes en el organismo, uno de los más eficientes en la eliminación de estos compuestos electrofílicos por

su conjugación con el glutathione es el sistema enzimático GST. El glutathione es un tripeptido nucleofílico que sirve como diana para compuestos electrofílicos evitando el ataque y daño de éstos a las macromoléculas celulares (ADN, proteínas, lípidos) (167-170). La conjugación con el glutathione está catalizada directamente por las enzimas GST, dando lugar a la formación de tioéteres (167-170). Los conjugados con el glutathione son eliminados directamente por la bilis, y en menor medida por la orina. En este último caso, antes de ser excretado, el conjugado sufre un proceso metabólico por el que secuencialmente es eliminado el resto γ -glutámico y la glicina de la molécula de glutathione y finalmente es acetilado el grupo amino de la cisteína, dando origen a derivados del ácido mercaptúrico que son los metabolitos que finalmente aparecen en la orina (167-170).

Así pues, las enzimas GST se encuentran implicadas en la detoxificación de una amplia variedad de xenobióticos, incluyendo sustancias hepatotóxicas y carcinógenos (170-173). Además, ciertos compuestos endógenos del tipo de las prostaglandinas, leucotrienos, hiperóxidos orgánicos (incluyendo hiperóxidos lipídicos y productos de peroxidación lipídica) y esteroides son sustratos de las enzimas GST (169,170).

Existen algunos conjugados con el glutathione con capacidad de reaccionar con macromoléculas celulares dañándolas. Así pues, la conjugación con el glutathione por las enzimas GST puede dar lugar a conjugados tóxicos y no tóxicos para la célula.

En función de la formación de compuestos estables o inestables para la célula se distinguen dos tipos de reacciones de conjugación cuyos sustratos también son diferentes (167,169). En el primer tipo de reacciones se forman

conjugados estables del glutathione con sustratos del tipo de los epóxidos, grupos alquilo y arilo y productos reactivos que provienen de reacciones catalizadas por el citocromo P-450. En el segundo tipo de reacciones el conjugado con glutathione es inestable de modo que reacciona nuevamente con otra molécula de glutathione (reacción no catalizada por GST) generando disulfuro de glutathione. Dos ejemplos de sustratos de este segundo tipo de reacción son los nitratos orgánicos y los hidroperóxidos orgánicos (167,169).

Varias de estas reacciones catalizadas por las enzimas GST se producen en ausencia de la enzima. Se sabe que el glutathione se encuentra presente en elevadas concentraciones en la mayor parte de los tejidos del cuerpo, pero se desconoce la importancia relativa de las reacciones enzimáticas vs. no enzimáticas en la prevención del daño celular. Por ejemplo, la prevención del daño hepático celular del paracetamol depende de la conjugación del metabolito reactivo del mismo con el glutathione. Si las concentraciones intracelulares del mismo son elevadas, el índice de formación de compuestos conjugados y la prevención de una posible formación de compuestos resultantes de la unión covalente a proteínas de dichos metabolitos reactivos se encuentra poco afectada por los niveles citosólicos de las enzimas GST. Sin embargo, si la concentración intracelular de glutathione disminuye, las reacciones catalizadas por las enzimas GST aumentan con respecto a las reacciones no enzimáticas, de modo que la presencia de enzimas GST se vuelve esencial para prevenir la unión covalente a proteínas de los reactivos tóxicos del paracetamol (169). Así pues, la prevención del daño hepático por las enzimas GST parece ser más importante si existe disminución de los niveles de glutathione intracelular (169).

Aunque los productos secundarios a las reacciones catalizadas por las enzimas GST son generalmente no tóxicos, ciertos componentes conjugados con el glutatión pueden bioactivarse y causar daño celular. Se han estudiado dos componentes tóxicos de este tipo: el conjugado secundario a su reacción con el etileno dibromida, conjugado que reacciona directamente con el ADN formando aductos de ADN que pueden ser mutagénicos, y el secundario a su reacción con algunos hidrocarburos halogenados que se metabolizan en el riñón formando un conjugado de cisteína que puede dar lugar a un reactivo letal para las células renales del túbulo proximal (169).

En resumen, para conocer la relevancia de las enzimas GST en la detoxificación y prevención del daño celular es necesario conocer el papel de sus enzimas en la función celular, conocer la relación entre la estructura y función de los mismos y determinar cómo se produce la regulación de la expresión de los enzimas GST en los diferentes tejidos (167-170).

1.6.3. FRECUENCIAS DE LAS DELECCIONES *GSTM1* Y *GSTT1* EN LAS DIFERENTES POBLACIONES.

La frecuencia del genotipo nulo *GSTM1* es elevada (aproximadamente del 50% en población control) y presenta variabilidad interétnica (170). La frecuencia del genotipo nulo *GSTT1* también es elevada pero la variabilidad en la distribución de su frecuencia entre las diferentes etnias es mayor. Las frecuencias más elevadas del genotipo homocigótico nulo *GSTT1* se han encontrado en poblaciones del Este Asiático, y las más bajas en los países escandinavos y en México (Tabla 4). Las tablas 4 y 5 reflejan la relevancia de las diferencias étnicas sobre todo en aquellas regiones con una gran

variabilidad racial. En un estudio reciente realizado en la India se reflejan dichas variaciones dentro del propio país, de forma que en el sur, la frecuencia del genotipo nulo *GSTM1* es del 30,4%, la del *GSTT1* del 16,8% y la de ambos del 4,6%, frecuencias diferentes a las observadas en las regiones de Karnataka donde se encuentra la mayor frecuencia del genotipo nulo *GSTM1* (36,4%) y de Andhra Pradesh donde la frecuencia de la combinación de ambos genotipos nulos *GSTM1*0* y *GSTT1* es la más baja (1,7%) (180).

En resumen, hemos de considerar la existencia de una variabilidad significativa de ambos genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1* entre las diferentes etnias, variabilidad más marcada en el caso de la delección homocigótica *GSTT1*.

Tabla 4. Estudios donde se muestran las diferencias étnicas en la frecuencia del genotipo *GSTT1*0*.

País/Región	% <i>GSTT1*1</i>	% <i>GSTT1*0</i>	Referencia
Este Asiático (Corea, China)	38%	62%	174
China (Shanghai)	51%	49%	175
USA (Blancos)	80%	20%	176
USA (Afro-americanos)	78%	22%	176
USA (Hispanos)	90%	10%	176
Alemania	75%	25%	177
Turquía	80%	20%	178
Países escandinavos	85%	15%	179

De acuerdo con la base de datos GSEC (Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens) (adaptado de referencia 152).

Tabla 5: Frecuencias alélicas en los diferentes grupos étnicos.

Alelo	Etnia	Nº	Homocigosis (media y rango)
<i>GSTM1*0</i>	Caucásicos	10.514	0,53 (0,42-0,6)
	Asiáticos	1.511	0,52 (0,52-0,54)
	Africanos	479	0,27 (0,26-0,36)
<i>GSTT1*0</i>	Caucásicos	5.577	0,19 (0,13-0,26)
	Asiáticos	555	0,47 (0,35-0,52)
<i>GSTM1*0</i> más	Caucásicos	5.537	0,1
<i>GSTT1*0</i>	Asiáticos	407	0,24

De acuerdo con la base de datos GSEC (Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens) (adaptado de referencia 152).

I.6.4. SUSTANCIAS METABOLIZADAS POR GSTM1 Y GSTT1.

A pesar de que se conocen múltiples sustratos metabolizados por las enzimas GST todavía no es posible definir con exactitud la afinidad de cada enzima GST hacia sustratos específicos al carecer de una comparación sistemática de todas las formas enzimáticas. Es conocido que existen sustancias metabolizadas específicamente por GSTM1 y GSTT1, por lo que su ausencia como consecuencia de la delección homocigótica en sus locus génicos (genotipos nulos) específicos da lugar a consecuencias específicas. Dentro del abanico de sustancias detoxificadas directa o indirectamente por estas enzimas tienen especial relevancia, por las potenciales consecuencias tóxicas de su acúmulo, los productos reactivos de oxígeno, los hidroperóxidos lipídicos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los hidrocarburos halogenados y el benceno (170).

En el ámbito de la farmacología (170), existen investigaciones que han relacionado el metabolismo de varios quimioterápicos con las enzimas GST (180-183). Concretamente la enzima GSTT1 presenta una gran afinidad por el quimioterápico 1,3-bis-(2-cloroetil)-1-nitrosurea observándose que la delección homocigótica *GSTT1* parece influir en la sensibilidad de los tumores a la quimioterapia y en la gravedad de los efectos secundarios de este antineoplásico (183). Con respecto a la relación de los polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1* y otros fármacos, disponemos de escasos datos procedentes de estudios con fármacos antipalúdicos (184) y mayor riesgo de hepatotoxicidad secundaria al tratamiento con tacrina (185), troglitazona (186) y FAT (48,49).

En lo referente a los FAT, en sendos estudios realizados en población india y china se determinó una mayor susceptibilidad a hepatotoxicidad secundaria a estos fármacos en los individuos portadores de la delección homocigótica nula *GSTM1* (48,49). A continuación se describen con detalle ambas investigaciones.

I.6.5. POLIMORFISMOS NULOS *GSTM1* Y *GSTT1* Y RIESGO DE HEPATOTOXICIDAD POR FÁRMACOS ANTITUBERCULSOSOS.

El glutathione juega un papel importante en la protección frente a metabolitos tóxicos procedentes del metabolismo de la H (Figura 1) gracias a su conjugación a través de las enzimas GST (50,53), y consecuente biotransformación, lo que facilita la eliminación de estos metabolitos tóxicos y reduce el riesgo potencial de hepatotoxicidad. Roy *et al* realizaron un estudio basado en la hipótesis de que las mutaciones homocigóticas nulas del *GSTM1* y *GSTT1* determinaban una ausencia total de actividad de cada isoforma enzimática y por lo tanto un mayor riesgo de HFAT. En dicho estudio, de casos y controles, observaron que de 33 pacientes que desarrollaron HFAT, diecisiete (52%) eran homocigotos “null” para *GSTM1*, comparado con un índice de positividad para el mismo de 8 de 33 (24%) controles ($p=0,01$) (49). Recientemente, Huang *et al* publicaron un trabajo en el que determinaron la influencia de los polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1* en el riesgo de HFAT, en el que también observaron una diferencia significativa en la presencia de *GSTM1* “null” entre casos y controles (66,7% vs. 46%; $p=0,02$) (48).

Por lo tanto, ambas investigaciones sugieren una relación entre el riesgo de HFAT y el genotipo nulo *GSTM1*. Dado que ambos estudios fueron

realizados en población asiática, y debido a la posible existencia de diferencias en la susceptibilidad a HFAT mediada por dichos polimorfismos nulos entre las diferentes poblaciones y etnias, se precisan estudios en otras poblaciones que proporcionen datos concretos sobre el posible papel de estos polimorfismos en la susceptibilidad a HFAT en cada una de ellas.

En la más reciente de sus investigaciones al respecto, Huang *et al* estudiaron una posible asociación entre el riesgo de hepatitis tóxica secundaria a otros fármacos hepatotóxicos (antibióticos, anti-inflamatorios no esteroideos, anticonvulsivantes, uricosúricos, anestésicos, antifúngicos, hipolipemiantes, antitiroideos y otros) y los genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1*, no encontrando ninguna asociación significativa (48).

I.6.6. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS NULOS *GSTM1* Y *GSTT1* CON DIFERENTES PATOLOGÍAS.

Aunque existen datos importantes que relacionan la delección de ambos locus *GSTM1* y *GSTT1* con la patogénesis de varias enfermedades, muchos de los resultados obtenidos de estudios epidemiológicos son contradictorios. Una de las limitaciones más importantes de estos trabajos es la inclusión de un número de sujetos insuficiente en el estudio. Por lo tanto, el análisis de resultados procedentes de meta-análisis debe ser realizado con cautela.

A continuación se analizan los resultados de estudios realizados a gran escala que analizan la relación entre ambos polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1* y algunas patologías crónicas.

Concretamente, ambas delecciones homocigóticas se han relacionado con la posibilidad de tener más riesgo de desarrollar enfermedades que cursan

con inflamación crónica y neoplasias (170). Dentro del primer grupo, varios estudios han demostrado que ambos genotipos nulos dan lugar a un aumento de riesgo de los efectos nocivos del tabaco sobre el riesgo cardiovascular (187,188) y un aumento del riesgo coronario secundario a la diabetes mellitus (189). Además, se ha evidenciado un aumento de los marcadores inflamatorios homeostáticos y de función endotelial (190). A pesar de que el desarrollo de la patología cardiovascular crónica es multifactorial, cada vez es más evidente la existencia de una relación patogénica entre los polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1*, ya que a pesar de que no disponemos de datos consistentes, todas estas investigaciones sugieren que tanto el *GSTM1* como el *GSTT1* poseen diferentes funciones en la cadena patogénica de acontecimientos.

Uno de los factores patogénicos de la EPOC es el estrés oxidativo secundario a productos derivados del humo del tabaco (191,192). Debido a que las enzimas GST participan en la detoxificación de dichas sustancias oxidantes, la relación entre los genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1* ha sido objeto de estudio. Concretamente disponemos de datos procedentes del estudio estudio SAPALDIA, cuyos resultados indicaron que la delección homocigótica nula *GSTT1*, aislada o combinada con la del *GSTM1* nula, está asociada de manera independiente con la caída de la función pulmonar en relación con la edad, más rápida en los varones que en las mujeres y de forma independiente del hábito tabáquico (193).

Aunque el fenotipo del asma es heterogéneo, al igual que en la EPOC, su patogenia reside en la inflamación crónica secundaria a una respuesta inflamatoria anormal a determinados factores ambientales. Por lo tanto, los polimorfismos *GSTM1* y *GSTT1* nulos podrían modular el riesgo de asma. A

pesar de investigaciones recientes (194-197) en las que se ha observado que alguno de esos genes podría ser un factor de riesgo de asma, no se han podido establecer grandes conclusiones en este campo debido a que la mayoría de la información está basada en muestras pequeñas. Es interesante reseñar que varias investigaciones han puesto de manifiesto una relación entre los genotipos *GSTM1* nulo y *GSP II*, tanto con el riesgo de asma inducida por exposición a isocianatos (198) y como la secundaria a inflamación alérgica inducida por el efecto de las partículas diesel eliminadas por los tubos de escape de los coches con este tipo de motor (199).

El papel de dichos polimorfismos nulos en el riesgo de determinadas enfermedades gastrointestinales también ha sido objeto de estudio. Los resultados más relevantes son los que relacionan el polimorfismo nulo *GSTM1* con un mayor riesgo de desarrollar hepatitis alcohólica y cirrosis biliar primaria (200,201). Dado el pequeño tamaño muestral, dichos resultados precisan confirmación en estudios más amplios.

También se ha estudiado la relación entre ambos genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1* y la patogenia de determinadas enfermedades autoinmunes como el LES y la artritis reumatoide (202-207), pero se precisan estudios más amplios para poder establecer conclusiones definitivas.

Dentro del grupo de las enfermedades neoplásicas los datos procedentes de los estudios que relacionan los polimorfismos *GST* con un aumento de la carcinogénesis revelan incrementos en el riesgo de cáncer debidos a la presencia de los genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1* de pequeña magnitud (odds ratio inferiores a 2) que aumenta cuando se combinan con otros polimorfismos genéticos como los del grupo del *citocromo P-450* o

factores ambientales como el tabaquismo (170,208). Hasta la fecha, disponemos información de más de 500 estudios que relacionan los genotipos del *GST* con el riesgo de cáncer de pulmón, cabeza y cuello, mama, hígado, gastrointestinal, urotelial, próstata y leucemia, pero los resultados no son consistentes para algunos de estos tipos de tumores. Los tipos de cáncer que parecen estar más relacionados con los polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1* son el de pulmón, cabeza y cuello e hígado.

El principal agente etiológico relacionado con el cáncer de pulmón es el tabaco y los genotipos *GST* modulan el efecto de las sustancias tóxicas derivadas del mismo, tanto por detoxificación de carcinógenos como por una eliminación de compuestos protectores (211-213). Los datos combinados de un reciente meta-análisis de todos los estudios más relevantes de los polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1* en el que se analizan 29.365 casos de cáncer de pulmón y 38.253 controles revelan un riesgo relativo de cáncer de pulmón de 1,18 (IC 95% 1,14-1,23) y 1,09 (IC 95% 0,95-1,14) para los genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1* respectivamente. Los principales factores determinantes de la heterogeneidad de los datos fueron el tamaño muestral y las variaciones interétnicas, de forma que parece que el genotipo nulo *GSTM1* se asocia de forma más débil en individuos de ascendencia europea (212). La relevancia de estas asociaciones de los polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1* tan débiles es incierta y constituye un aspecto muy debatido y criticado. Cada vez existe más evidencia de que la combinación de varios polimorfismos de enzimas detoxificadores (sobre todo de los genes *GSTM1*, *GSTP1* y *CYP1A1*) parecen incrementar la susceptibilidad a cáncer de pulmón sobre todo en sujetos fumadores (213).

Una reciente revisión sobre la epidemiología molecular del cáncer de los tumores de cabeza y cuello evidencia que las causas principales de estos tipos de tumores son el hábito tabáquico y el consumo de alcohol (214). La influencia de ciertos polimorfismos enzimáticos en el riesgo de cáncer de cabeza y cuello es difícil de determinar. Al igual que para el cáncer de pulmón se ha observado que la combinación del polimorfismo nulo *GSTM1* con *CYP1A1* incrementa el riesgo de cáncer de la cavidad oral y esofágico en fumadores (215,216). Sin embargo, otros estudios más recientes muestran una falta de relación entre dichos polimorfismos *GSTM1*0*, *GSTT1*0* y *CYP1A1* y la predisposición a cáncer de cabeza y cuello (217,218). Debido a estas controversias, Hashibe *et al* realizaron un meta-análisis de 31 estudios publicados de casos y controles con un total de 4.635 casos y 5.770 controles. Las odds ratio para los tumores de cabeza y cuello fueron 1,23 (IC 95% 1,06-1,42) para el genotipo nulo *GSTM1*, 1,17 (IC 95% 0,98-1,40) para el genotipo nulo *GSTT1*, 1,1 (IC 95% 0,82-1,31) para los portadores del alelo *GSTP1 Val105*, y 1,35 (IC 95% 0,95-1,82) para los portadores del alelo *CYP1A1 Val462* (219). Por lo tanto, dicho meta-análisis prueba la existencia de una modesta asociación entre los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* y el riesgo de tumores de cabeza y cuello (219).

En resumen, cada vez es más evidente que el riesgo de este tipo de tumores depende de la interacción entre el consumo tabáquico y alcohol y los polimorfismos de los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *CYP1A1*.

Con respecto a las neoplasias del tracto gastrointestinal, los primeros estudios realizados al respecto no mostraron asociaciones significativas entre el riesgo de desarrollo de neoplasias orales, esofágicas y gástricas y los genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1* (220). Con respecto al genotipo nulo *GSTM1*

y su relación con el riesgo de cáncer colorrectal se ha determinado una asociación significativa en un amplio estudio en el que se incluyeron 1.130 casos y 2.519 controles (221). También se ha visto que la combinación de ambos genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1* dan lugar a un pequeño incremento en el riesgo de cancer colorrectal (222). Los datos procedentes de estudios que analizan la relación de dichos polimorfismos con el carcinoma hepatocelular, neoplasia ligada a la infección crónica por VHB y VHC y a la exposición a aflatoxina B1, muestran un mayor riesgo de la misma ante la presencia de los genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1* (223,224). Por lo tanto, en el estudio de la patogénesis del carcinoma hepatocelular es importante dilucidar la interacción entre factores ambientales (virales y químicos) y factores genéticos (*GSTM1* y *GSTT1*).

Con respecto a tumores en otras localizaciones (mama, urotelial, próstata, cerebro y leucemia) los datos procedentes de los estudios realizados son contradictorios, por lo que precisan confirmarse en estudios más amplios (170,208).

I.7. POLIMORFISMOS DEL *CYP2E1*.

I.7.1. INTRODUCCIÓN:

El complejo enzimático del citocromo P-450 (P-450 o CYP) está compuesto por varias enzimas cuyo centro catalítico está formado por un complejo hemo-porfirina. Solamente algunos de los múltiples genes que codifican el complejo citocromo P-450 están relacionados con el metabolismo de los fármacos (225). Los enzimas se dividen en familias y subfamilias en función de la similitud entre las secuencias genéticas codificantes de forma que dos enzimas de una misma subfamilia presentan una similitud en la secuencia de ADN de aproximadamente un 70% (225).

Las reacciones catalizadas por los enzimas P-450 son de oxidación (226). En el transcurso de dichas reacciones se pueden originar intermediarios electrófilos reactivos, compuestos ávidos de electrones capaces de abstraerlos a otras biomoléculas que pueden reaccionar con nucleófilos presentes en la célula y/o unirse covalentemente a macromoléculas. El resultado es por tanto una reacción de bioactivación del compuesto. La reacción de oxidación implica una reducción parcial de la molécula de oxígeno. Ello conlleva un considerable aumento de la reactividad, que la propia molécula de oxígeno carece. Si la activación del oxígeno queda confinada en el centro catalítico del enzima, la reacción transcurre hasta la oxidación del sustrato sin mayores incidencias. Sin embargo, en ocasiones, las reacciones pueden no completarse totalmente, bien por impedimentos estéricos del propio sustrato, bien porque algunas enzimas dejan escapar con relativa facilidad (concretamente el CYP2E1) intermediarios reactivos, generando anión superóxido, peróxido e incluso

radicales derivados de la propia molécula sustrato. Así pues, se originan especies químicamente reactivas capaces de interaccionar con biomoléculas de la célula causando daño celular (226).

El CYP2E1 (EC 1.14.14.1) es uno de los enzimas del complejo P-540 mejor conocidos. Los enzimas CYP2E1 humanos y de los roedores catalizan reacciones similares, por lo que los ratones son buenos modelos para determinar sus sustratos. Se han estudiado más de 70 sustratos metabolizados por este enzima entre los cuales se encuentran alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, solventes halogenados y algunos fármacos (51,52). Son los responsables de la activación metabólica de nitrosaminas, relacionadas con la patogénesis de algunos tumores (227). Se expresan en el hígado y son inducidos, tanto a nivel hepático como en otros tejidos, fundamentalmente por la acetona, etanol, benceno, H y otros, compuestos que son, en su mayoría, sustratos del grupo enzimático (52,53). Cuantitativamente, comprenden aproximadamente el 7% de todas las isoformas del P-450 en el hígado.

La variabilidad interindividual en la expresión enzimática del CYP2E1, aunque no se conoce totalmente, parece tener explicación en la gran cantidad de polimorfismos del gen *CYP2E1*. Existen numerosos trabajos cuyo objetivo ha sido encontrar una asociación entre el polimorfismo genético del *CYP2E1* y la susceptibilidad a los daños producidos por fármacos y tóxicos (52). La distribución de la frecuencia de los polimorfismos del *CYP2E1* es variable en función de la población (152,228).

El gen *CYP2E1* es uno de los más complejos en la nomenclatura de los polimorfismos. Una de las variantes alélicas principales es la caracterizada por

la ausencia de la diana de restricción *RsaI* (alelo *CYP2E1*5* o alelo *c2*) localizada en la región reguladora de la transcripción.

En contraste con la gran cantidad de información existente acerca de la funcionalidad y variabilidad de otros enzimas CYP, existe poca evidencia acerca de la influencia de los polimorfismos del *CYP2E1* en la funcionalidad del enzima y en el incremento de susceptibilidad a desarrollar efectos tóxicos secundarios al metabolismo de los diferentes compuestos (52).

I.7.2. POLIMORFISMOS DEL *CYP2E1*.

La asociación del polimorfismo genético del *CYP2E1* y la susceptibilidad a los daños producidos por exposición a tóxicos ha recibido una atención creciente. Son muchos los trabajos publicados que hacen referencia al papel de dicho gen en determinados procesos metabólicos y su relación con varias patologías.

El gen *CYP2E1* se encuentra en el cromosoma 10 en la localización 10q24.3-qter (229). Estructuralmente está formado por 9 exones y 8 intrones, que codifican a la proteína CYP2E1 formada por una secuencia de 496 aminoácidos. Dentro de los genes codificadores de los enzimas CYP, el *CYP2E1* es uno de los más diversos. Solus *et al* secuenciaron 11 genes del *CYP* en una muestra de 93 individuos en la que se incluyeron personas de ascendencia caucásica, afroamericana y asiática (228). En lo que se refiere al *CYP2E1*, encontraron 32 variantes alélicas de las cuales 13 ya se habían reportado previamente. La frecuencia global de las mismas fue inferior al 1% en 23 variantes. En dicha investigación se reflejan diferencias interétnicas importantes (228).

El Comité de Nomenclatura del P-450 humano del instituto Karolinska (<http://www.cypalleles.ki.se/index.htm>) en su última actualización, enumera 13 variantes alélicas del *CYP2E1* con haplotipo determinado (Tabla 6). La mayoría de dichos polimorfismos se encuentran en la región promotora y en los intrones.

El alelo *CYP2E1*1A* (también llamado alelo *c1*) es el alelo “wild-type” y se caracteriza por presentar la diana de restricción *RsaI* en la región reguladora del gen. La actividad del enzima codificado por dicho alelo es normal. Los polimorfismos determinados por las enzimas de restricción *RsaI*, *PstI* y *DraI* (alelos *CYP2E1*5A* y **5B* respectivamente) se han asociado con alteraciones en la expresión del gen ya que las dianas de restricción *RsaI* y *PstI* se encuentran en zonas reguladoras de la transcripción (Tabla 6).

El alelo *CYP2E1*5* (también denominado alelo *c2*), caracterizado por la pérdida de la diana de restricción *RsaI*, parece estar asociado con cambios a nivel transcripcional, dando lugar a alteraciones en los índices de actividad catalítica de la enzima (230,231) (Tabla 3). El polimorfismo *RsaI* se encuentra en la región adyacente 5' del gen, región en la que residen varios factores reguladores negativos de la actividad transcripcional del gen.

Otro de los polimorfismos es el denominado *CYP2E1*6*, caracterizado por pérdida de la diana de restricción *DraI* (232), localizada en el intrón 6. Las implicaciones de dicho polimorfismo sobre la funcionalidad del enzima están poco claras (231,232) (Tabla 6).

Tabla 6: Polimorfismos del *CYP2E1*.

Gen	Proteína	Cambio nucleótido	RFLP	Efecto	Actividad enzimática	Referencia
<i>CYP2E1*1A</i>	CYP2E1.1	Ninguno (wildtype)			Normal	229
<i>CYP2E1*1B</i>	CYP2E1.1	9896C>G	TaqI-			233, 234
<i>CYP2E1*1C</i>	CYP2E1.1	6 repeticiones en la región flanqueante 5'				235
<i>CYP2E1*1D</i>	CYP2E1.1	8 repeticiones en la región flanqueante 5'	DraI y XbaI			235, 236
<i>CYP2E1*2</i>	CYP2E1.2	1132G>A		R76H	Reducida	237
<i>CYP2E1*3</i>	CYP2E1.3	10023G>A		V389I	Normal	237
<i>CYP2E1*4</i>	CYP2E1.4	4768G>A		V179I	Normal	238
<i>CYP2E1*5A</i>	CYP2E1.1	-1293G>C, -1053C>T, 7632T>A	PstI+, RsaI-, DraI-			230-232
<i>CYP2E1*5B</i>	CYP2E1.1	-1293G>C, -1053C>T	PstI+, RsaI-			230,231
<i>CYP2E1*6</i>	CYP2E1.1	7632T>A	DraI-			232
<i>CYP2E1*7A</i>	CYP2E1.1	-333T>A				238
<i>CYP2E1*7B</i>	CYP2E1.1	-71G>T; -333T>A				238
<i>CYP2E1*7C</i>	CYP2E1.1	-333T>A; -352A>G				

*Adaptado de <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm>

I.7.3. DIFERENCIAS INTERÉTNICAS.

La distribución de la frecuencia de los polimorfismos varía de forma importante entre los diferentes grupos étnicos. Se ha observado que la presencia de muchas de las variaciones alélicas más infrecuentes se encuentran restringidas a un grupo étnico, por lo que podrían ser específicas de cada población (152,228). La funcionalidad de la proteína puede verse afectada por cambios menores en la secuencia genética, y muchos de esos cambios parecen ser específicos de la población.

El polimorfismo *CYP2E1*5B* es más frecuente en asiáticos que en el resto de las poblaciones. En un estudio realizado en Taiwán la distribución de las frecuencias de los genotipos **1A/*1A*, **1A/*5B* y **5B/*5B* fue del 58, 35,1 y 6,9% respectivamente, registrándose una frecuencia del alelo **5B* del 24% (239). En caucásicos la frecuencia de dicho alelo es inferior, entre el 3 y el 4%, aunque mayor que la registrada en afroamericanos, entre el 0,3 y el 1% (240). En un estudio llevado a cabo en Brasil se observó que la frecuencia de dicho alelo era significativamente diferente entre población blanca y no blanca, 7% frente al 3% respectivamente, por lo que la frecuencia del alelo **5B* en población blanca de origen brasileño es similar a la reportada en caucásicos (241).

En el estudio de Solus *et al*/ se corroboran estos hallazgos y además se analizan de forma detallada la frecuencia del resto de las variantes alélicas en caucásicos, afroamericanos y asiáticos (228).

I.7.4. FUNCIÓN ENZIMÁTICA DEL CYP2E1.

Colectivamente los enzimas del citocromo P-450 son responsables del metabolismo fase I de muchos compuestos endógenos y exógenos. La capacidad metabolizadora de cada individuo depende de muchos factores, entre los que se incluyen los factores ambientales, la edad, el sexo, la nutrición y los factores genéticos.

Los enzimas CYP catalizan la oxidación de muchos compuestos de modo que precisan electrones para reducir el oxígeno molecular, salvo contadas excepciones en las que la enzima utiliza peróxidos en lugar de oxígeno molecular. Los CYP se clasifican en cuatro clases en función de cómo acceden los electrones desde el NADPH hasta el centro catalítico de la enzima (242). Pero el resultado de la actividad enzimática del CYP no siempre es la inserción de oxígeno en la molécula sustrato, pudiendo catalizar también reacciones de deshidratación, deshidrogenización, isomerización, dimerización, e incluso reducción (242).

La amplia distribución tisular de los CYP se debe probablemente al gran número de funciones que realizan. No obstante, el hígado es el órgano con mayor expresión de estos enzimas y en él se encuentran tanto los CYP implicados en reacciones fisiológicas como los encargados del metabolismo de fármacos y xenobióticos (51,242). Se estima que alrededor del 70% de los CYP hepáticos pertenecen a las familias de 1 a 3. Precisamente, estas tres familias son las que catalizan la mayor parte de las reacciones de biotransformación de sustratos exógenos. La expresión hepática de los CYP varía entre los diferentes individuos como consecuencia de factores genéticos, fisiopatológicos y ambientales (225,226). Los diferentes fenotipos pueden traducirse en

variaciones significativas del metabolismo de algunos fármacos en determinados individuos y, como consecuencia de ello, pueden observarse alteraciones de sus parámetros farmacocinéticos, disminución de su eficacia terapéutica o un mayor riesgo de aparición de efectos adversos. La edad, el sexo por factores hormonales y diferentes estados fisiológicos como el embarazo o el ayuno, alteraciones fisiopatológicas que afectan a la homeostasis del organismo, como los desequilibrios hormonales, procesos inflamatorios, obesidad, neoplasias o enfermedades hepáticas, pueden modular el patrón de CYP debido a modificaciones en la expresión de dichos enzimas y de su capacidad funcional (225,226). La expresión de los enzimas CYP está modulada por el ayuno y la reducción de la ingesta calórica; además ciertos componentes de los alimentos que no pueden considerarse nutrientes como aditivos alimentarios (conservantes, estabilizantes, colorantes, antioxidantes, etc), compuestos indólicos presentes en ciertos vegetales, la cafeína, flavonoides naturales de ciertos vegetales, terpenoides y una larga lista de compuestos a la que habría que añadir los productos que se generan como consecuencia de la preparación de los alimentos a elevadas temperaturas, pueden producir inducción o inhibición de los CYP (243,244).

El CYP2E1, es el único miembro de la subfamilia CYP2E identificado en la especie humana. Se expresa mayoritariamente en el hígado (51,52). Este enzima participa en la activación de ciertos carcinógenos (hidrocarburos halogenados, nitrosaminas), en el metabolismo de solventes de uso común como etanol, acetona o benceno y varios fármacos entre los que cabe destacar el paracetamol, clorzoxazona, H y ciertos anestésicos (p.ej. halotano, enflurano) (51).

Dos características del CYP2E1 son su polimorfismo y su inducibilidad por etanol y otros compuestos (acetona, H) y también por ciertos estados fisiopatológicos tales como la diabetes y el ayuno (51,52,225,226).

I.7.5. CYP2E1 Y RIESGO DE TOXICIDAD.

El objetivo final del CYP y del resto de enzimas implicados en el metabolismo de xenobióticos, es transformar el sustrato en metabolitos más fácilmente excretables del organismo. Durante estas reacciones de biotransformación, el fármaco o el tóxico sufre cambios en su estructura química convirtiéndose en un metabolito sin actividad farmacológica e inocua desde el punto de vista toxicológico. Sin embargo, metabolización no es sinónimo de inactivación, y son numerosos los ejemplos de xenobióticos que se convierten en moléculas tóxicas tras su metabolismo (52,225,226). Los metabolitos formados son especies reactivas que interaccionan con elementos o procesos celulares formando radicales libres y otros metabolitos (epóxidos alifáticos o aromáticos, quinonaimidas) capaces de modificar covalentemente macromoléculas (proteínas, ADN) o de producir interacciones no covalentes (p. ej. estrés oxidativo). El balance entre las reacciones de activación metabólica y de inactivación es lo que determina la gravedad de la toxicidad. Como ya se ha reseñado, este balance depende de múltiples factores (polimorfismos genéticos, inducción, inhibición, factores dietéticos, interacciones entre fármacos, etc) y puede mostrar notables diferencias a nivel individual (51,52,225,226,242,243). La bioactivación afecta tanto a fármacos como a xenobióticos. Entre los primeros, uno de los ejemplos mejor conocidos es el de la H (Figura 1).

Los procesos de activación también conducen a la conversión de procarcinógenos en carcinógenos. Las enzimas de la subfamilia CYP1A1 juegan un papel muy destacado por su capacidad de activar gran número de procarcinógenos procedentes de la combustión de diferentes hidrocarburos y que pueden acceder al organismo principalmente por inhalación (227).

La medición en el hígado del índice metabólico del CYP2E1 con cada sustrato es la manera más óptima de determinar su actividad. Para ello, se pueden medir anticuerpos monoclonales o policlonales contra los enzimas CYP mediante Western blot o utilizar ratones transgénicos “knockout”, método que permite medir la actividad específica de cada isoforma enzimática CYP *in vivo* (51).

Los principales compuestos en cuyos efectos clínicos y tóxicos se ha visto implicado el CYP2E1 son ciertos anestésicos, el paracetamol, el alcohol y los FAT.

I.7.5.1. ANESTÉSICOS.

El halotano es un anestésico volátil metabolizado por el CYP2E1 principalmente, dando lugar a ácido trifluoroacético, bromida e intermediarios reactivos que pueden acetilar proteínas del hígado con el consiguiente riesgo de hepatitis tóxica. Eliasson *et al* determinaron que el balance entre la activación metabólica por el CYP2E1 y la detoxificación de metabolitos reactivos podría ser un factor de riesgo de la hepatitis secundaria a este fármaco (245).

I.7.5.2. PARACETAMOL.

Se trata de un fármaco que se metaboliza mayoritariamente en el hígado (>95%). Su degradación puede tener lugar por reacciones de conjugación con grupos sulfato o con ácido glucurónico (>90%), y por oxidación a través del CYP2E1 (<5%) (51). El CYP2E1 puede convertir el paracetamol en metabolitos reactivos con capacidad de unirse covalentemente a proteínas y, de ese modo, producir hepatotoxicidad (51). Lee *et al* observaron en ratones con ausencia de expresión del CYP2E1 generada por recombinación homóloga de células madre embrionarias, que el tratamiento con paracetamol era menos hepatotóxico que en los animales “wildtype”, por lo que dedujeron que el CYP2E1 es el principal enzima responsable de la conversión metabólica de dicha droga en metabolitos hepatotóxicos (246).

I.7.5.3. ALCOHOL.

El alcohol es el tóxico en cuyos efectos se ha visto mayor implicación del CYP2E1. Las tres posibles vías metabólicas encargadas de la oxidación del etanol en el hígado son la de la alcohol deshidrogenasa (ADH), la de la catalasa peroxisomal y la del sistema oxidante del alcohol a nivel microsomal. Las tres vías metabólicas catalizan la conversión del alcohol a acetaldehído (247). La enzima ADH es la principal responsable de este proceso. Se ha observado que el consumo habitual prolongado y en grandes cantidades de alcohol induce vías alternativas de metabolismo del alcohol independientes de la ADH (247). Otras enzimas, y en particular las que forman parte del sistema oxidante microsomal, incluyendo el CYP2E1, se encuentran implicadas en el

metabolismo del alcohol a dosis altas, observándose que incluso llegan a metabolizar más del 10% del alcohol ingerido (248).

Dado que las mismas enzimas microsomales metabolizan tanto el alcohol como otros xenobióticos, el metabolismo de estos últimos CYP es inhibido ante la presencia de concentraciones elevadas de etanol, en parte debido a la competición por una vía de oxidación común (51). Por lo tanto, el consumo concomitante de alcohol con otras drogas puede dar lugar a un aumento de la concentración de la droga y mayor riesgo de sobredosis. El aumento o disminución de la hepatotoxicidad por otras drogas secundaria a la ingesta de alcohol se ha observado en el caso de la H (aumento) (249), fenilbutazona (aumento) (249), propiltiuracilo (reducción) (250) y clormetiazol (inhibición de la expresión del CYP2E1) (251). Se ha visto que varias drogas como el pentobarbital, la wafarina, la fenitoina, la tolbutamida, el propanolol, la R y la metadona aumentan su índice de aclaramiento cuando son administradas en conjunto con ingesta enólica (12,51).

La coadministración de paracetamol aumenta el riesgo de hepatotoxicidad. Existen dos posibles mecanismos que explican este hecho: a) por un aumento de los compuestos implicados en la peroxidación lipídica, b) por una disminución de la actividad de los enzimas antiperoxidasa (superóxido dismutasa y catalasa) y de los niveles de glutathione (252).

El CYP2E1 es regulado a nivel transcripcional y post-transcripcional a través de la estabilización proteica inducida por el sustrato, de tal forma que el consumo crónico de etanol lleva a un incremento de la proteína por disminución en su degradación, sin afectar al ARNm; esta inducción enzimática lleva a un incremento del metabolismo del etanol que puede contribuir al desarrollo de

dependencia. Así pues el etanol puede aumentar el contenido de CYP2E1 así como la oxidación catalítica de sustratos del CYP2E1, lo que explica la mayor susceptibilidad a compuestos hepatotóxicos de los alcohólicos (247). El alelo determinado por la ausencia de la diana de restricción *RsaI* (alelo *c2*) se ha asociado con una mayor actividad transcripcional, niveles de proteína y actividad enzimática en comparación con el alelo “wild-type” *c1/c1*, por lo que la mayor actividad transcripcional secundaria al genotipo *c2/c2* podría jugar un papel importante en el desarrollo de hepatopatía alcohólica grave (253).

El polimorfismo *CYP2E1*D* se ha asociado con una mayor susceptibilidad a ser inducido por lo que parece que es uno de los contribuyentes al desarrollo de dependencia alcohólica y de nicotina. Dicho polimorfismo contiene una secuencia repetida en la región adyacente 5', que puede dar lugar a una disminución de ciertos factores que intervienen en la regulación negativa de la expresión génica (235). Se ha observado una mayor actividad del CYP2E1 en individuos homocigóticos y heterocigóticos para dicho alelo (235).

1.7.5.4. FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS.

Tal y como se ha explicado anteriormente, el CYP2E1 interviene en la degradación de la H concretamente en la oxidación de de la MAH dando como resultado metabolitos hepatotóxicos (Figura 1) (12,28,50,88). El índice de producción de dichas hepatotoxinas va a depender directamente de la actividad de la enzima.

El efecto de la H sobre la actividad del CYP2E1 es más complejo que el de otros compuestos. Así pues se ha determinado que dicha influencia sobre

la actividad del CYP2E1 es bifásica en función del tiempo. Durante la administración de H la actividad del CYP2E1 se encuentra inhibida y cuando su administración se interrumpe se produce un aumento de la actividad de dicha enzima (45,249,50). Los polimorfismos determinados por los enzimas de restricción *RsaI* y *PstI* se encuentran localizados en la región reguladora de la transcripción del gen, por lo que se relacionan con los índices de expresión génica (231). Varios estudios han demostrado que el polimorfismo determinado por la ausencia de la diana de restricción del *RsaI* (alelo *c2*) se asocia a una mayor actividad del enzima CYP2E1 (231,254), en comparación con el alelo wildtype (alelo *c1*). Sin embargo, también existen trabajos en los que no se evidencia ninguna relación entre el polimorfismo *RsaI* y la actividad basal del CYP2E1 (47,255,256). En el estudio realizado por Huang *et al* en población asiática encontraron una relación significativa entre la presencia del alelo “wildtype” y el riesgo de HFAT (47). En otro estudio realizado en una muestra poblacional caracterizada por la presencia de heterogeneidad racial, encontraron una asociación entre dicho alelo y el riesgo de hepatotoxicidad secundaria a H administrada en monoterapia para el TITL, en el grupo de ascendencia asiática (37). Sin embargo, en el reciente estudio de Cho *et al* llevado a cabo en población coreana, no se observó un mayor riesgo de HFAT asociado al mismo (45). En este trabajo también determinaron el riesgo asociado a los polimorfismos determinados por repeticiones en la región adyacente 5' (*1A, *1C y *1D), no encontrando ninguna relación significativa entre su presencia y el riesgo de HFAT, tanto de forma individual como en combinación con el alelo “wildtype” *c1* (45).

I.7.6. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS *CYP2E1* CON OTRAS PATOLOGÍAS.

Diversos estudios sugieren que las diferencias en los niveles basales de CYP constituyen una de las principales fuentes de variabilidad interindividual en la respuesta a xenobióticos (257). En este contexto, varios estudios han demostrado correlaciones entre diversas actividades del CYP y el riesgo de algunas enfermedades secundarias a la acción tóxica del alcohol, el tabaco y la generación de cáncer en diversos tejidos (258,259).

Se ha determinado que el consumo crónico de alcohol da lugar a un aumento de la proteína CYP2E1, así como otros factores como la dieta rica en grasas, la diabetes y la obesidad, por lo que tienen un efecto modulador del metabolismo del alcohol (51). Se ha observado una correlación positiva entre la inducción del CYP2E1 por el alcohol y la generación de radicales libres y la peroxidación lipídica. Por lo tanto, la inducción del CYP2E1 aumenta el daño hepático producido por el alcohol mientras que su inhibición lo disminuye (260). La mayor actividad transcripcional del polimorfismo *c2/c2* se ha visto relacionado con un incremento de la susceptibilidad a hepatopatía por el alcohol cuando se asocia al polimorfismo **3* del gen que codifica la enzima ADH (261). Parece que la combinación de ambos alelos puede modular el riesgo de hepatopatía alcohólica, hecho no demostrado para cada uno de los mismos de forma individual (262). El polimorfismo *CYP2E1*8* (8 repeticiones en la región adyacente 5') se ha asociado con una mayor capacidad de inducción del enzima por el alcohol (235). Sin embargo, en un reciente estudio en el que se analizó la frecuencia de dicho polimorfismo en 239 alcohólicos y 208 controles se observó una menor presencia de dicho polimorfismo en los

individuos alcohólicos (247). Wong *et al* llevaron a cabo un estudio sobre ciertos polimorfismos del *CYP2E1* y el riesgo de hepatopatía alcohólica y carcinoma hepatocelular y posteriormente realizaron un meta-análisis de la literatura (263). Observaron que el polimorfismo determinado por la ausencia de la diana de restricción *TaqI* fue menos frecuente en los individuos alcohólicos, y dado que dicho polimorfismo no se relacionaba directamente con una alteración del metabolismo del alcohol; este resultado podría explicarse porque esté ligado a otros factores protectores por el momento desconocidos (263). En un meta-análisis de varios estudios sobre la relación entre el polimorfismo determinado por la enzima de restricción *RsaI* y el riesgo de hepatopatía alcohólica no se determinó una influencia significativa del mismo sobre el riesgo de hepatopatía alcohólica (262). En resumen, los resultados de los estudios de asociación de los polimorfismos del *CYP2E1* con la hepatopatía alcohólica son controvertidos y no muestran una asociación clara.

Otra de las enfermedades en las que se ha determinado una influencia de los polimorfismos del *CYP2E1* en el riesgo de su desarrollo es la EPOC, fundamentalmente derivado del importante papel del *CYP2E1* en el metabolismo de nitrosaminas alquiladas procedentes de la combustión del tabaco (263).

El *CYP2E1* es un complejo enzimático propuesto como posible marcador de cáncer debido a su actividad sobre varios xenobióticos (benceno, estireno, anilina, etc) que pueden ser activados por el *CYP2E1* dando lugar a sustancias carcinógenas (227). Los polimorfismos determinados por las enzimas de restricción *RsaI* y *PstI*, que se encuentran ligados, y *DraI*, determinan una sobreexpresión del gen (231,268). Los polimorfismos metabólicos

determinados por estas variaciones se han asociado con un aumento del riesgo de cáncer incluidos los de pulmón (265), próstata (266) y gástrico (267) en diferentes poblaciones. Los datos reportados muestran una gran variabilidad en la frecuencia de estas variantes alélicas, que parece depender del perfil genético de las poblaciones estudiadas. Por otro lado, en otros estudios, no se han encontrado asociaciones entre dichos alelos y la patología neoplásica, por lo que parece necesario realizar más estudios que incluyan un mayor número de individuos para poder establecer la utilidad de estos posibles biomarcadores de susceptibilidad a cáncer. Uno de los aspectos más estudiados ha sido su relación con el cáncer de pulmón. Los resultados son controvertidos por lo que no está clara su relación con los polimorfismos del *CYP2E1*. Existen trabajos que no muestran asociación (374,268-271) y otros en los que si se ha encontrado (227).

Dado el carácter multifactorial del cáncer se deben evaluar varios factores metabólicos implicados en la susceptibilidad individual.

II. Justificación y Objetivos

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

En la revisión bibliográfica realizada se comprueba que se han estudiado ciertos factores genéticos que determinan un mayor riesgo de HFAT.

Existen varios polimorfismos de enzimas que participan en la detoxificación hepática de la H y R que dan lugar a un fenotipo metabólico diferente y, por lo tanto, un desequilibrio entre la producción y degradación de hepatotoxinas derivadas del metabolismo de dichos fármacos, confiriendo al individuo una mayor susceptibilidad de desarrollar hepatotoxicidad secundaria (12,19,50,88).

Los datos de los que disponemos provienen de estudios realizados mayoritariamente en poblaciones asiáticas, por lo tanto, debido a la posible existencia de diferencias inherentes a la raza, sería necesario determinar estos factores genéticos y su influencia sobre el riesgo de hepatotoxicidad en caucásicos. Su determinación identificaría a individuos con riesgo de desarrollo de hepatitis tóxica secundaria a estos fármacos, lo que condicionaría una monitorización clínica más estricta o incluso un cambio a regímenes de tratamiento menos hepatotóxicos. Por lo tanto, el estudio de dichos polimorfismos podría constituir una aproximación de la posible aplicación de la farmacogenética y farmacogenómica en la prevención futura de la toxicidad hepática de los FAT.

Ante estas premisas nos planteamos los siguientes objetivos:

II.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la influencia de los polimorfismos *5, *6 y *7 del *NAT2* determinantes de velocidades de acetilación lentas, los polimorfismos nulos

GSTM1 y *GSTT1* determinantes de una ausencia de la actividad enzimática de las enzimas *GSTM1* y *GSTT1* y los genotipos *c1/c1*, *c1/c2* y *c2/c2* del *CYP2E1* como factores de riesgo de HFAT en una muestra de población de raza caucásica.

II. 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

1. Relacionar los factores de riesgo genético de HFAT con la gravedad de la hepatotoxicidad.
2. Determinar la prevalencia de dichos polimorfismos genéticos la población de ascendencia caucásica de la zona sur de Galicia.
3. Definir las necesidades de controles analíticos o clínicos adecuados para el seguimiento de estos pacientes en función de su genotipo en los loci indicados.

III. Metodología

III. METODOLOGÍA.

III.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Estudio de casos y controles anidado en una cohorte.

III.2. SELECCIÓN DE LOS SUJETOS A ESTUDIO.

Los sujetos a estudio fueron enfermos de TB tratados y seguidos de forma prospectiva.

Fuente de sujetos: la mayor parte de los pacientes del estudio proceden de la UTB del Servicio de Neumología del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI). Se trata de una consulta monográfica de TB que cubre un área de influencia de unos 500.000 habitantes (área sur de Pontevedra) donde se siguen más de 150 enfermos nuevos al año y más de 500 TITL con H al año. Se dispone de una base de datos de todos los pacientes desde el año 1998 que incluye las siguientes variables: filiación, datos sociodemográficos, datos clínicos, tipo de TB, dosis y pauta de tratamiento, pruebas de función hepática basales (transaminasas, bilirrubina, FA y parámetros de coagulación), serologías de VHB, VHC y VIH, seguimiento analítico a los 15 días, 1º, 2º y 4º mes de tratamiento y situación final de cada caso. También se han incluido algunos sujetos procedentes de la UTB perteneciente al Complejo Hospitalario de Pontevedra (CHOP) con un área de influencia de unos 250.000 habitantes.

Definición de casos y controles: los casos son enfermos de TB que desarrollaron HFAT en cualquier momento durante el tratamiento. El diagnóstico de hepatotoxicidad se realizó ante elevaciones de las transaminasas (AST y/o ALT) superiores a 3 veces los LSN (> 120 UI/L)

definidos como 37 UI/L para el ALT y 38 UI/L para el AST según los valores de referencia de nuestro laboratorio. Los controles son enfermos de TB que no desarrollaron esta complicación.

III.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Pacientes adultos (mayores de 14 años).
- Demostración diagnóstica de TB activa.
- Tratamiento con pautas que incluyeron como mínimo H, R y Z.
- Dosificación de los fármacos habitual: 5 mg/Kg/día (máximo 300 mg/día) de H; 10 mg/Kg/día (máximo 400 mg/día) de R y 25-30 mg/Kg/día (máximo 2.000 mg/día) de Z.
- Seguimiento correcto.
- Aceptación del paciente a participar en el estudio y firma del consentimiento informado.

III.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Pruebas de función hepática alteradas al inicio del tratamiento.
- Serologías para VIH, VHB y VHC positivas.
- Consumidores habituales de alcohol y/o drogas hepatotóxicas.
- Embarazadas.
- Mala adherencia al tratamiento.

Método de selección de casos y controles: se incluyeron todos los casos de HFAT procedentes de la UTB de Vigo desde enero del año 1998 hasta noviembre del 2007. Además se incluyeron todos los casos de HFAT

diagnosticados en la UTB de Pontevedra desde enero del 2005 hasta noviembre del 2007.

Los controles fueron enfermos de TB que no desarrollaron HFAT y todos procedieron de la UTB de Vigo. La selección de los mismos se realizó mediante un muestreo aleatorio simple de la cohorte de enfermos de TB tratados y seguidos en la UTB de Vigo entre enero de 1998 y noviembre del 2007.

III.3. VARIABLES A ESTUDIO.

A todos los pacientes, durante el seguimiento, se les realizaron controles clínicos cada 2 semanas durante el primer mes y posteriormente mensuales, hasta la finalización del tratamiento. Los controles analíticos incluyeron la realización de hemograma, coagulación y bioquímica incluyendo AST, ALT, FA, bilirrubina y ácido úrico a los 15-30 días del tratamiento y al final del 2º y 4º mes, y posteriormente cada 2 meses si el tratamiento se prolongó más de 6 meses. Esta frecuencia se incrementó ante la aparición de síntomas de hepatitis o si se detectaron elevaciones de los valores de los enzimas hepáticos por encima de los basales. Todos los pacientes fueron advertidos de forma verbal y por escrito de los posibles síntomas de hepatotoxicidad y se les indicó un número de teléfono de contacto. La adherencia al tratamiento se controló mediante la realización de metabolitos de H en orina y el recuento de comprimidos en cada visita. Los pacientes con riesgo de abandono o mal cumplimiento se incluyeron en un programa de tratamiento directamente observado. El diagnóstico de HFAT se realizó ante elevaciones de las transaminasas superiores a 3 veces los LSN (> 120 UI/L) en pacientes asintomáticos o con síntomas de hepatitis, como anorexia, náuseas o vómitos,

o dolor abdominal. La clasificación de gravedad de la hepatotoxicidad se hizo de acuerdo con el pico máximo de transaminasas alcanzado, adoptando la clasificación de toxicidad de la OMS (22), definiéndose como hepatotoxicidad leve las elevaciones de la AST y/o ALT entre 3-5 veces los LSN (121-200 UI/L); moderada elevaciones de 5-10 veces los LSN (201-400 UI/L); y grave, elevaciones de más de 10 veces los LSN (> 400 UI/L).

Las variables registradas fueron la edad, sexo, IMC, localización de la TB (pulmonar, pleural o extrapulmonar), régimen terapéutico, dosificación de cada fármaco, síntomas de hepatitis, niveles basales y durante el seguimiento de AST, ALT, FA, ácido úrico, bilirrubina y parámetros de coagulación.

III.4. ESTUDIO GENÉTICO DE LOS POLIMORFISMOS.

Se estudiaron los polimorfismos del *NAT2* 5*, 6* y 7*, interpretando su ausencia como la presencia del alelo 4* ("wild-type"). Las combinaciones homocigóticas y heterocigóticas del alelo 4* fueron definidas como genotipos acetiladores rápidos, siendo genotipos acetiladores lentos el resto de las combinaciones de los polimorfismos del gen *NAT2* estudiados. En cuanto al gen *GST*, se estudiaron los locus *GSTM1* y *GSTT1*, de forma que se definieron los polimorfismos nulos de ambos genes en caso de delección homocigótica del gen. El polimorfismo del *CYP2E1* estudiado fue el c2, interpretando su ausencia como la presencia del alelo salvaje c1.

III.4.1. TOMA DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ADN.

Se realizó extracción de ADN a partir de leucocitos de sangre periférica anticoagulada con ácido etilen-diamino-tetra-acetato (EDTA). Para dicho

procedimiento se utilizó el kit comercial FlexiGene DNA-QIAGEN (QUIAGEN GmbH). Siguiendo las indicaciones del protocolo de la casa comercial la extracción de ADN se realizó en 6 etapas que se describen a continuación.

Etapas de la extracción de ADN:

1. Pipetear el Buffer FG1 en un tubo tipo falcon. Sobre él añadir la sangre entera (volumen ajustado según protocolo) y homogenizar invirtiendo el tubo 5 veces.
2. Centrifugar a 3.500 r.p.m. durante 13 minutos (min).
3. Descartar el sobrenadante. Invertir el tubo sobre papel de filtro limpio durante 2 min (observar que no se desprenda el pellet).
4. Preparar el Buffer FG2 más QUIAGEN Protease ajustando el volumen de cada uno de ellos según el volumen de sangre.
5. Añadir el Buffer FG2/QIAGEN Protease (volumen ajustado según protocolo) y realizar vórtex de cada muestra hasta que el pellet esté completamente disuelto [3-4 pulsos de vórtex de 5 segundos (seg) cada uno; en el caso de que queden trazas visibles de pellet añadir 1 ml de Buffer FG2 y vórtex de nuevo].
6. Invertir el tubo 3 veces. Incubar a 65° C 10 min.
7. Añadir el isopropanol (100%) (volumen ajustado según protocolo) e invertir el tubo enérgicamente hasta que el precipitado de ADN sea visible (como una malla o hebra).
8. Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 3 min.
9. Desechar el sobrenadante. Invertir el tubo sobre papel de filtro limpio durante 2 min.

10. Añadir etanol al 70% (volumen ajustado según protocolo) y vórtex durante 5 seg.
11. Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 3 min.
12. Desechar el sobrenadante. Invertir el tubo sobre papel de filtro limpio durante al menos, 5 min (hasta que el pellet de ADN evapore el etanol completamente).
13. Añadir el Buffer FG3 (volumen ajustado según protocolo) y realizar vórtex durante 5 seg a baja velocidad. Incubar a 65° C durante 1 hora para desnaturalizar el ADN).
14. Aplicar un spin para recuperar toda la muestra. Alicuotar, identificar y congelar a -20°C.

III.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR).

El objetivo de la PCR es la amplificación directa de un fragmento de ADN.

III.4.2.1. PCR gen *NAT2*:

Amplificación del fragmento del gen *NAT2* que contiene los alelos *5, *6 y *7 tras adaptar a las condiciones de nuestro laboratorio la metodología utilizada por Neugebauer *et al* (39). Se utilizaron los primers 5'-AGATGTGCAGCCTCTAGAA-3' y 5'-ATTAGTGAGTTGGGTGATAC-3'. El volumen final de las reacciones fue de 25 µl. En la tabla 7 se detallan las concentraciones iniciales y finales de los reactivos.

Tabla 7: Cantidades de los reactivos PCR del NAT2

Concentración Inicial	Concentración final
Tp10x	1x
dNTPs (40mM)	800 μ M
PNAT2F (10 μ M)	10 pm
PNAT2R (10 μ M)	10 pm
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 mM
TAQ (5 U/ μ l)	0,5 U
Agua	c.s.p. 25 μ l
ADN (100 ng/ μ l)	100 ng
Volumen final	25 μ l

Las etapas de amplificación fueron, en primer lugar, una fase inicial a 94° 5 min, posteriormente una amplificación durante 35 ciclos a 94° 60 seg, 55° 60 seg, 72° 60 seg y una extensión a 72° durante 5 min. Los fragmentos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 0,7% con bromuro de etidio a 0,1 μ g/ml tras electroforesis y visualización con luz ultravioleta. Se utilizaron bandas de control interno. El tamaño del fragmento obtenido fue de 534 pb (pares de bases) (Figura 5).



Figura 5: Fragmentos de 534 pb correspondientes al producto de amplificación del gen NAT2.
(M) Marcador de 1000 pb.

III.4.2.2. PCR genes *GSTM1* y *GSTT1*:

Amplificación del fragmento de ADN codificante de ambos locus *GSTM1* y *GSTT1* según metodología previamente descrita adaptada a las condiciones de nuestro laboratorio (49). Para la amplificación del *GSTM1* se utilizaron los primers 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' y 5'-TTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' y para el *GSTT1* los primers 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCT-3' y 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'. Las reacciones se realizaron con un volumen final de 25 µl con los reactivos que se muestran en las tablas 8 y 9. Las etapas de amplificación fueron idénticas en ambos casos. Tras una etapa inicial a 94° 5 min, se realizó una amplificación llevándose a cabo 30 ciclos a 94° 60 seg, 56° 60 seg, 72° 60 seg y por último una extensión a 72° durante 5 min. Los fragmentos amplificados se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% con bromuro de etidio a 0,1 µg/ml y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Los genotipos nulos del *GSTM1* fueron detectados por la ausencia de producto de PCR (210 pb) en el gel de electroforesis realizada con control interno positivo y negativo. Igualmente los genotipos nulos del *GSTT1* fueron detectados por la ausencia de producto de PCR (430 pb) con bandas de control interno. Todas las muestras que presentaban bien *GSTM1* nulo o bien, *GSTT1* nulo fueron nuevamente amplificadas mediante una PCR conjunta en las mismas condiciones de amplificación (Figura 6).

Tabla 8: Cantidades de los reactivos PCR del *GSTM1*

<i>Concentración Inicial</i>	Concentración final
Tp10x	1x
dNTPs (40mM)	800 µM
PGSTM1F (10 µM)	10 pm
PGSTM1R (10 µM)	10 pm
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM
TAQ (5 U/µl)	0,5 U
Agua	c.s.p. 25 µl
ADN (100 ng/µl)	100 ng
Volumen final	25 µl

Tabla 9: Cantidades de los reactivos PCR del *GSTT1*

<i>Concentración Inicial</i>	Concentración final
Tp10x	1x
dNTPs (40mM)	800 µM
PGSTT1F (10 µM)	10 pm
PGSTT1R (10 µM)	10 pm
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 mM
TAQ (5 U/µl)	0,5 U
Agua	c.s.p. 25 µl
ADN (100 ng/µl)	100 ng
Volumen final	25 µl



Figura 6: PCR conjunta *GSTM1* y *GSTT1*. Los fragmentos de 430 pb se corresponden con la presencia de *GSTT1* y los de 210 pb con la presencia de *GSTM1*. (C) Marcador de 1000 pb.

III.4.2.3. PCR gen *CYP2E1*:

Amplificación específica de la región del gen *CYP2E1* en la que se localiza la sustitución de nucleótidos que define al alelo *c2* o alelo **5* según metodología previamente descrita adaptada a las condiciones de nuestro laboratorio (240). Las secuencias de primers utilizados fueron 5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3' y 5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3'. Las concentraciones inicial y final de los reactivos de la PCR se describen en la tabla 10. El volumen final de las reacciones fue de 25 µl. Las etapas de amplificación se describen a continuación: etapa inicial a 94° 4 min y 30 ciclos de 94° 1 min, posteriormente amplificación a 53° 1 min 20 seg, 72° 1 min 30 seg y por último extensión a 72° durante 5 min. Los fragmentos (410 pb) se visualizaron con luz ultravioleta en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio a 0,1 µg/ml previa electroforesis (Figura 7).

Tabla 10: Concentraciones de los reactivos PCR del *CYP2E1*.

Concentración Inicial	Concentración final
Tp10x	1x
dNTPs (40mM)	800 μ M
PCYP2E1F (10 μ M)	10 pm
PCYP2E1R (10 μ M)	10 pm
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM
TAQ (5 U/ μ l)	0,5 U
Agua	c.s.p. 25 μ l
ADN (100 ng/ μ l)	100 ng
Volumen final	25 μ l

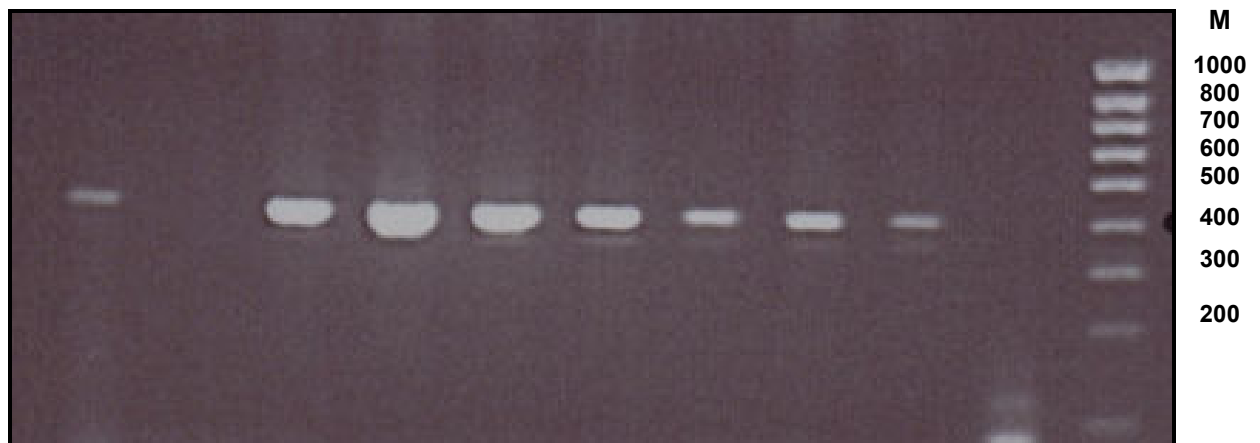


Figura 7: Fragmentos de 410 pb correspondientes al producto de amplificación del gen *CYP2E1*. (M) Marcador de 1000 pb.

III.4.3. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN: TÉCNICA RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS).

La técnica RFLP se basa en la digestión de una secuencia específica de ADN por enzimas de restricción, cuya principal característica es la especificidad de reconocimiento de una secuencia concreta de ADN llamada sitio de reconocimiento o diana de restricción y el consiguiente corte de ADN a ese

nivel. Los fragmentos originados se pueden diferenciar según su tamaño en gel de agarosa mediante electroforesis dando lugar a un mapa de restricción que permite la diferenciación de polimorfismos.

III.4.3.1. DIGESTIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DEL GEN *NAT2*.

Para la diferenciación de los alelos resultantes de los genotipos lentos del gen *NAT2* utilizamos 3 enzimas de restricción, de forma que cada uno de ellos identifica el polimorfismo correspondiente de cada alelo. Para la identificación del polimorfismo *5 utilizamos la enzima *KpnI*, para el polimorfismo *6 la enzima *TaqI* y para el polimorfismo *7 la enzima *BamHI*. Las digestiones fueron realizadas según metodología previamente descrita adaptada a las condiciones de nuestro laboratorio (140). Al igual que en otros estudios (37,39,43-46,49) la ausencia de dichos polimorfismos lentos fue interpretada como genotipo acetilador rápido.

Digestión mediante *KpnI*:

Digestión del producto de PCR específico sobre la diana de restricción 5'-GGTAC/C-3' (diana de restricción de *KpnI*). El volumen inicial y final de los reactivos necesarios para la digestión se muestran en la tabla 11, cálculos llevados a cabo para un volumen final de 20 µl. Tras la realización de la mezcla se incubó a 37°C durante 12 horas. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio a 0,1 µg/ml y se visualizaron los fragmentos con luz ultravioleta. Se añadió un control interno negativo en cada digestión. La interpretación de los resultados según el tamaño de los fragmentos se muestra en la figura 8.

Tabla 11: Concentración inicial y final de los reactivos necesarios para la digestión por *KpnI* (para un volumen final de 20 μ l).

Concentración inicial	Concentración final
Enzima <i>KpnI</i> (10 U/ μ l)	0,25 U
TP 10x	1x
BSA (10 mg/ml)	0,1 mg/ml
Agua	c.s.p. 20 μ l
PCR	3 μ l
Volumen final	20 μ l

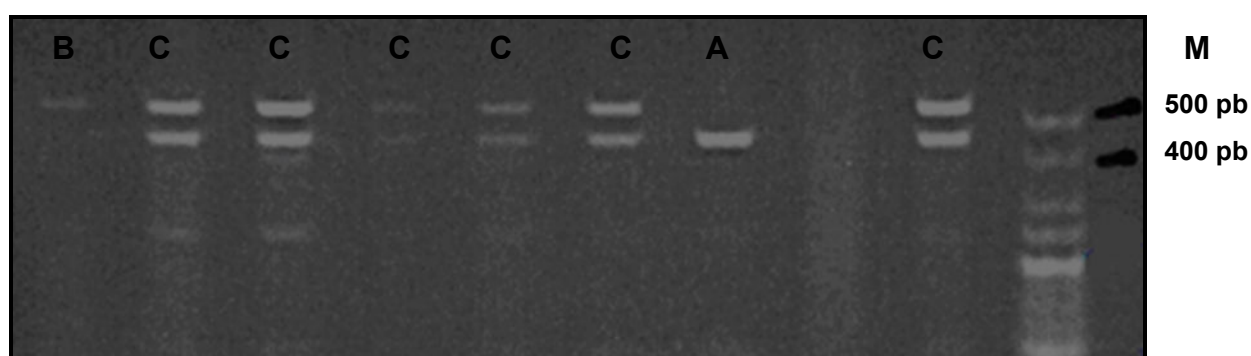


Figura 8: Patrones de los fragmentos resultantes de la digestión del fragmento del gen *NAT2* por por *KpnI*. (A), patrón normal, fragmentos de 442 y 72 pb; (B), alelo *5 en homocigosis, fragmento de 534 bp; (C), alelo *5 en heterocigosis, fragmentos de 534, 442 y 72 pb. (M), marcador de 500 pb

Digestión por *TaqI*:

La enzima *TaqI* actúa específicamente sobre la diana de restricción 5'-T/CGAS-3'. La digestión se llevó a cabo sobre el volumen final de la mezcla de los reactivos correspondientes (Tabla 12) y tras incubación a 65°C durante 3 horas. Los fragmentos resultantes de la digestión (incluyendo control negativo)

se observaron en gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio a 0,1 µg/ml con un transiluminador de luz ultravioleta (Figura 9).

La interpretación de los reultados se realizó tal y como se expone en la figura 12 según el tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión.

Tabla 12: Concentración inicial y final de los reactivos necesarios para la digestión por *TaqI*.

<i>Concentración inicial</i>	Concentración final
Enzima <i>TaqI</i> (10 U/µl)	0,04 U
Tp 10x	1x
Agua	c.s.p. 20 µl
PCR	3 µl
Volumen final	20 µl

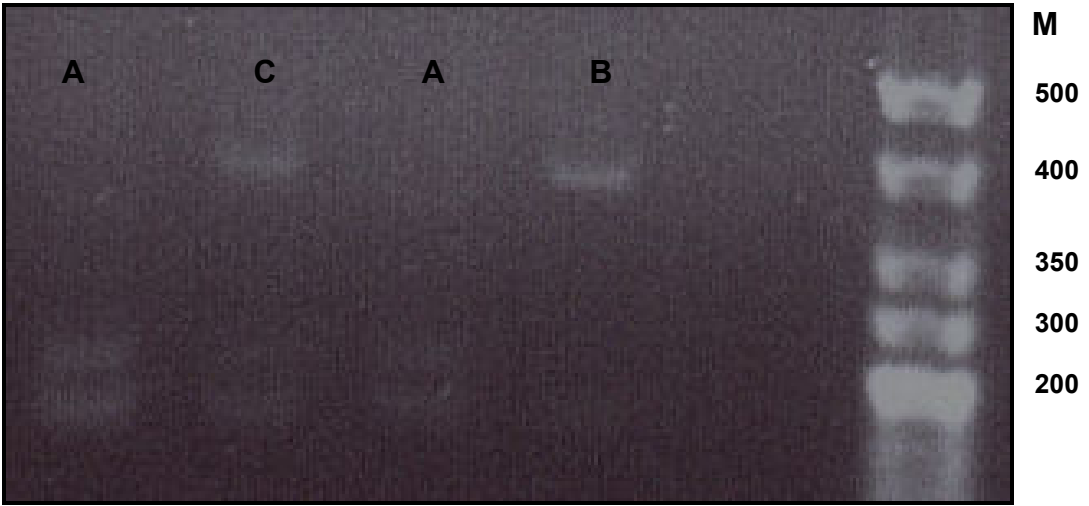


Figura 9: Patrones de los fragmentos resultantes de la digestión del fragmento del gen *NAT2* por *TaqI*. (A), patrón normal, fragmentos de 334 y 200 pb; (B), alelo *6 en homocigosis, fragmento de 534 bp; (C), alelo *6 en heterocigosis, fragmentos de 534, 334 y 200 pb. (M), marcador de 500 pb.

Digestión por *Bam*HI:

La diana de restricción de la enzima *Bam*HI es la secuencia 5'-G/GATCC-3'. Los reactivos utilizados para la digestión se muestran en la tabla 13. Una vez realizada la mezcla se incubó a 37 °C durante 12 horas. La separación de los fragmentos resultantes de la digestión tuvo lugar tras electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio a 0,1 µg/ml. La visualización de los mismos se realizó a través de un transiluminador de luz ultravioleta (Figura 10). Se añadió un control negativo interno en cada digestión. Los resultados obtenidos se interpretaron según el tamaño de los fragmentos tal y como se expone en la figura 14.

Tabla 13: Concentración inicial y final de los reactivos necesarios para la digestión por *Bam*HI.

<i>Concentración inicial</i>	Concentración final
Enzima BamHI (10 U/µl)	0,5 µl
Tp 10x	2 µl
Agua	c.s.p. 20 µl
PCR	3 µl
Volumen final	20 µl

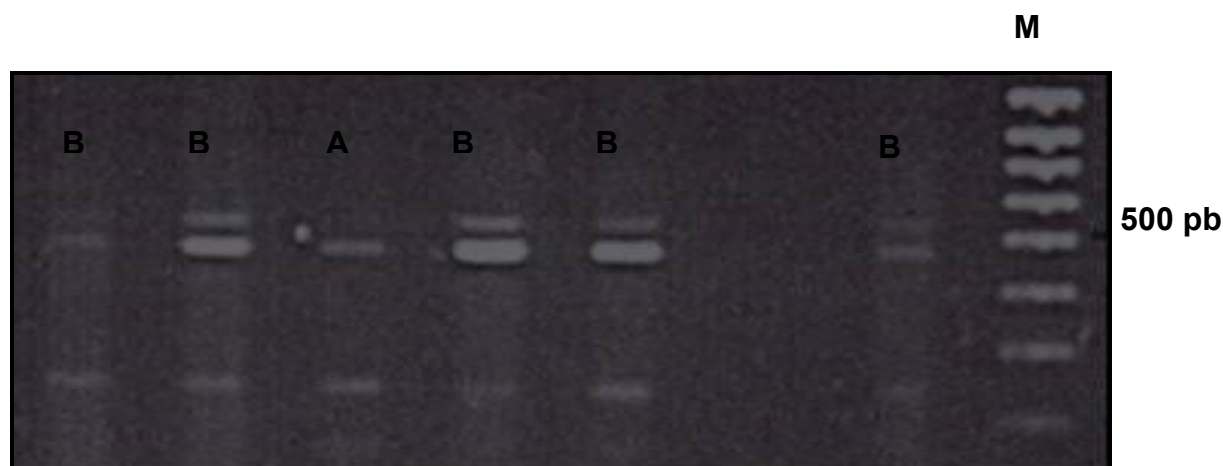


Figura 10: Patrones de los fragmentos resultantes de la digestión del fragmento del gen *NAT2* por *BamHI*. (A), patrón normal, fragmentos de 468 y 66 pb; (B), alelo *7 en heterocigosis, fragmentos de 534, 468 y 66 bp; (M) marcador de 1000 pb.

III.4.3.1. DIGESTIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DEL GEN *CYP2E1*.

La detección del alelo *c2* del gen *CYP2E1* se realizó mediante la digestión del producto específico de PCR del gen *CYP2E1* con la enzima *RsaI*, cuya diana de restricción es la secuencia 5'-GT/AC-3' según metodología previamente descrita adaptada a las condiciones de nuestro laboratorio (240). Los reactivos que se precisaron para la digestión se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Concentración inicial y final de los reactivos implicados en la digestión del fragmento amplificado del gen *CYP2E1* por *RsaI*.

Concentración inicial	Concentración final
Enzima <i>RsaI</i> (10 U/μl)	0,25 μl
Tp 10x	1x
Agua	c.s.p. 20 μl
PCR	3 μl
Volumen final	25 μl

El volumen final de la mezcla de digestión se incubó a 37°C durante 12 horas. El producto resultante de la digestión fue separado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro o de etidio a 0,1 µg/ml y visualizado mediante luz ultravioleta incluyendo un control negativo en cada procedimiento (Figura 11). En la figura 11 se muestra la interpretación de los resultados según el tamaño de los productos resultantes de la digestión.

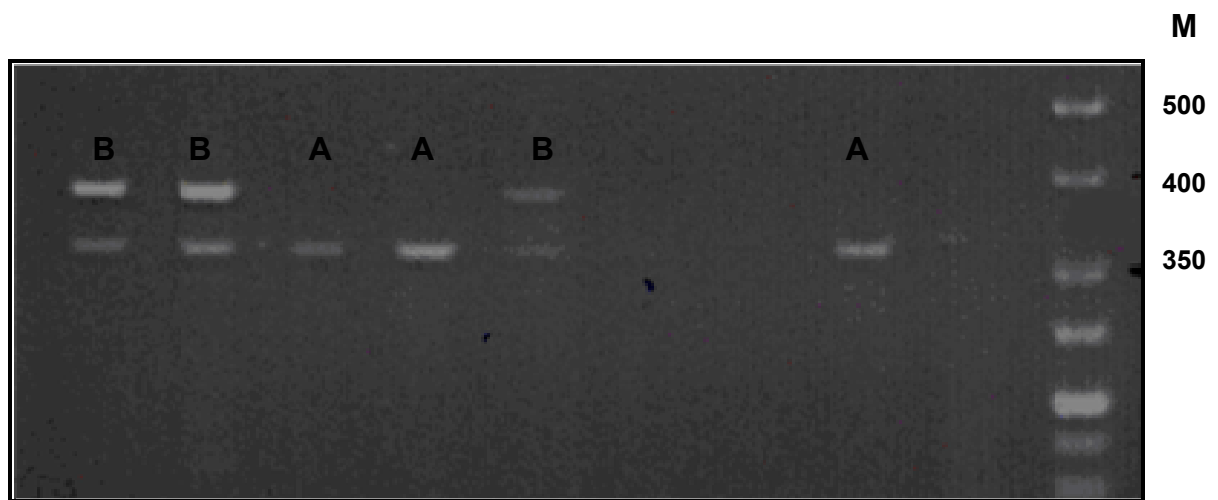


Figura 11: Patrones de los fragmentos resultantes de la digestión del producto amplificado del gen *CYP2E1* por *RsaI*. (A), patrón normal, fragmentos de 360 y 50 pb; (B), alelo *c2 en heterocigosis, fragmentos de 410, 360 y 50 bp; (M) marcador de 500 pb.

III. 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La comparación de las variables discretas se llevó a cabo mediante la prueba del Chi-cuadrado con la corrección para la continuidad de Yates o el test exacto de Fisher cuando algunos de los valores esperados era menor de 5. Para el análisis de las variables cuantitativas se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para valorar la normalidad de la muestra, aplicando si ésta era normal, la *t* de Student y si no lo era, la prueba de Mann-Whitney.

Se consideró estadísticamente significativa una $p \leq 0,05$.

Los resultados globales se expresaron como porcentajes y frecuencias absolutas para las variables cualitativas y como la mediana y el rango intercuantil (RIQ) para la cuantitativas. Los datos se puntuaron en función de su naturaleza, de forma que en el caso de variables cuantitativas se obtuvieron los valores reales, mientras que en el caso de las cualitativas se asignaron valores categóricos.

Las odds ratio (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) de la relación entre las diferentes polimorfismos (*GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo, *NAT2* *5, *6 y *7 y *CYP2E1* c1 y c2) y la hepatotoxicidad se calcularon mediante un análisis univariante. Para estudiar la influencia independiente de los polimorfismos analizados, se realizó un análisis multivariante mediante un modelo de regresión logística binaria por el método stepwise de todos aquellos factores que podrían ser factores de confusión (edad, sexo, estado nutricional evaluado mediante el IMC ($\text{IMC} = \text{peso}/[\text{altura en metros}]^2$) y niveles de transaminasas basales.

Los cálculos se llevaron a cabo con el programa estadísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versión 14, Chicago;IL).

III.5. CRONOGRAMA DEL ESTUDIO.

La inclusión de los sujetos comenzó en octubre del 2004 y se prolongó hasta diciembre del 2007. Se incluyeron todos los casos de hepatotoxicidad secundaria a fármacos antituberculosos registrados en la UTB de Vigo desde el año 1998, y posteriormente todos los casos nuevos que fueron apareciendo hasta la fecha en las UTB de Vigo y Pontevedra. Los controles fueron enfermos diagnosticados a partir del 2004.

Antes del comienzo del análisis de los polimorfismos se adecuaron los procedimientos de laboratorio a nuestras condiciones de trabajo durante un mes hasta que se pusieron a punto las técnicas de PCR y RFLP.

El análisis de los polimorfismos se realizó de forma independiente. En primer lugar se analizaron los polimorfismos nulos del *GSTM1* y *GSTT1*, posteriormente los polimorfismos *5, *6 y *7 del *NAT2* y finalmente los polimorfismos *c1* y *c2* del *CYP2E1*.

Posteriormente se realizó el análisis de resultados.

IV. Resultados

IV. RESULTADOS.

IV. 1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO.

Sobre una cohorte de 1.200 pacientes enfermos de TB activa seguidos y tratados entre enero de 1998 y agosto de 2006 se seleccionaron todos los casos de HFAT susceptibles de formar parte del estudio, un total de 40 (3,3%), de los cuales 35 dieron su consentimiento. Además, fueron seleccionados 70 enfermos TB activa que no desarrollaron HFAT, de los cuales 60 dieron su consentimiento para participar. Por lo tanto, la población final del estudio fue de 95 pacientes, treinta y cinco dentro del grupo de los casos y 60 en el grupo de los controles.

La mediana de edad de estos 95 pacientes fue de 32 años (RIQ 25-45) (Tabla 15). La población a estudio fue constituida por 40 (42,1%) varones y 55 (57,9%) mujeres (Figura 12).

El estado nutricional, medido mediante el IMC fue adecuado en todos los individuos integrantes del estudio, siendo la mediana de 22,1 Kg/m² (RIQ 20,2-22,1). La localización de la TB fue torácica en 89 (93,6%) pacientes, siendo pleurales un 11,5%. De las extrapulmonares 5 casos se correspondieron con TB ganglionar y los restantes 3 casos fueron TB de localización génitourinaria. De los 95 pacientes, 85 (89,5%) no refirieron ingesta enólica mientras que los otros 10 restantes el consumo fue de menor a 20 g de etanol diarios. En el 66,3% los fármacos antituberculosos utilizados fueron combinaciones de H, R y Z, en el 31,6% a dichos fármacos se asoció E y en el 2,1% se asoció S. En cuanto al hábito tabáquico, el 26,3% eran fumadores activos y el 21,1% exfumadores, siendo la mediana del consumo de 15 paquetes-años (RIQ 4,5-22). Los valores de las transaminasas antes del inicio del tratamiento fueron 20

UI/L (RIQ, 14-27) para la ALT, 20 UI/L (RIQ, 17-26) para la AST, 20 UI/L (RIQ, 17-32) para la GGT, 104 UI/L (RIQ, 61-175) para la FA y 0,26 mg/dL (RIQ, 0,3-0,36) para la bilirrubina. Las características basales (edad, sexo, IMC, localización de la TB y pruebas basales de función hepática) fueron similares en casos y controles (Tabla 15).

Dentro de los casos de hepatotoxicidad el pico máximo de transaminasas alcanzado fue de 239 UI/L (RIQ 158-362), 130 UI/L (RIQ 88-231), 54 UI/L (RIQ 54 (RIQ 39-97), 106 UI/L (RIQ 71-205) y 0,4 mg/dL (RIQ 0,3-0,6) para la ALT, AST, GGT, FA y bilirrubina respectivamente. La mediana de tiempo desde el comienzo del tratamiento hasta el pico de transaminasas fue de 45 días (RIQ 20-69). En 15 (42,8%) casos la hepatotoxicidad fue leve, en 14 (40%) moderada y en 6 (17,1%) grave. De los 35 casos de hepatotoxicidad 10 (28,5%) refirieron algún tipo de sintomatología relacionada con la hepatotoxicidad (Figura 13).

Figura 12: Distribución por sexos.

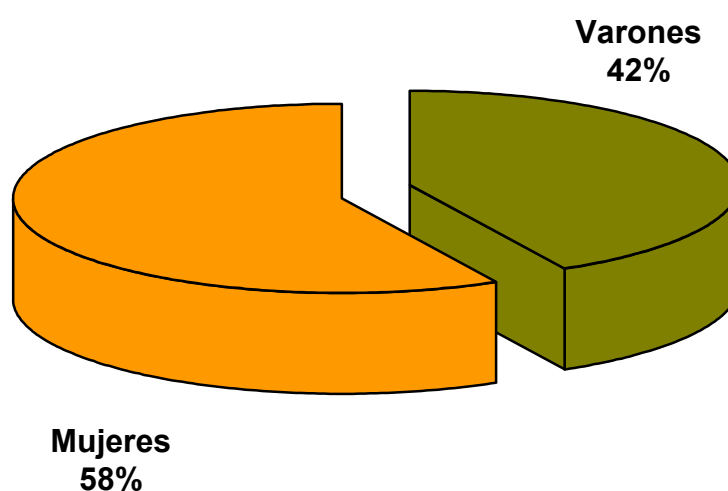
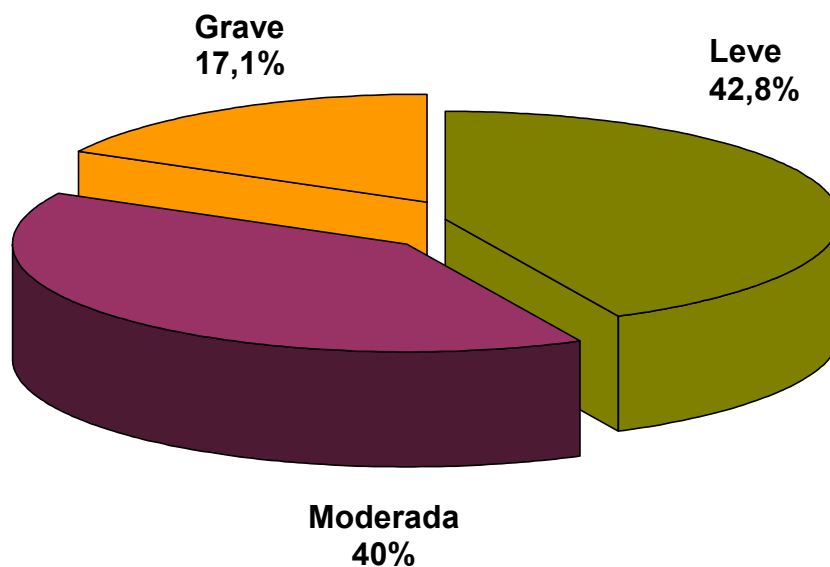


Tabla 15. Características basales de casos y controles.

	Casos	Controles	
	n = 35	n = 60	p
Edad (años)	34 (24-50)	31 (25-42)	0,27
Sexo (varones)	21 (60.0%)	35 (58.3%)	0,75
Localización TB (torácica)	33 (94,2%)	56 (93.3%)	0,85
IMC (kg/m²)	23,1 (20,3-25,4)	22 (20-24)	0,3
ALT (UI/L)	20 (19-28)	18.5 (13-26)	0,16
AST (UI/L)	22 (19-26)	20 (16-23)	0,07
GGT (UI/L)	21 (17-30)	20,5 (17-36)	0,76
Bilirubina (mg/dL)	0,36 (0,3-0,6)	0,36 (0,3-0,4)	0,65

Las variables numéricas se expresan como la mediana y el RIQ (entre paréntesis) y las variables cualitativas como la frecuencia absoluta y los porcentajes (entre paréntesis).

Figura 13: Gravedad de la hepatotoxicidad.



IV. 2. POLIMORFISMOS DEL GEN *NAT2*.

Los polimorfismos del gen *NAT2*, 4*, 5*, 6* y 7* fueron determinados en los 95 pacientes. La frecuencia de cada uno de estos alelos fue del 37,8%, 67,4%, 55,8% y 11,6% para los alelos 4*, 5*, 6* y 7* respectivamente. La frecuencia global de los genotipos acetiladores lentos fue del 61,1%. En población control el alelo más frecuente fue el 5* (71,7%) seguido por orden del 6* (55%) y el alelo “wildtype” 4* (40%), siendo el menos frecuente el alelo 7* (10%). En los casos, las frecuencias de dichos alelos fueron similares, no observando diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles (Tabla 16). El número de acetiladores rápidos fue de 12 (34,3%), de los que el 14,3% de los casos fueron homocigóticos para el alelo 4*, y en el 85,7% restante dicho alelo se encontró en heterocigosis con los alelos 5* (14,3%), 6* (2,9%) y 7* (2,9%) (Tabla 16). En la población control el porcentaje de acetiladores rápidos fue del 40%, sin diferencias estadísticamente significativas en comparación con los casos (Tabla 16). El genotipo más frecuente en este grupo fue el 4*/5* (15%), seguido del 4*/6* (13,3%), 4*/4* (10%) y, por último, el 4*/7* (1,7%). Tampoco se observaron diferencias significativas en la frecuencia de dichos genotipos acetiladores lentos en comparación con los casos (Tabla 16). La frecuencia de acetiladores lentos fue del 65,7% en los casos y del 60% en los controles, sin diferencias significativas entre ambos grupos. El genotipo más frecuente, con bastante diferencia respecto a los demás, fue el 5*/6* (35,7%), presente en un porcentaje de pacientes similar tanto en casos como en controles (34,3% vs 36,7%). En cuanto a las frecuencias del resto de los genotipos lentos tampoco observamos

diferencias entre casos y controles con la excepción del genotipo 6*/7* que solamente fue hallado en 3 casos ($p = 0,02$) (Tabla 16).

Tabla 16: Polimorfismos del gen NAT2.

	CASOS	CONTROLES	
	<i>n</i> = 35	<i>n</i> = 60	p
4*	12 (34,3%)	24 (40%)	0,58
5*	21 (60%)	43 (71,7%)	0,24
6*	20 (57,1%)	33 (55%)	0,83
7*	5 (14,3%)	6 (10%)	0,52
Acetiladores rápidos	12 (34,3%)	24 (40%)	0,58
4*/4*	5 (14,3%)	6 (10%)	0,52
4*/5*	5 (14,3%)	9 (15%)	0,92
4*/6*	1 (2,9%)	8 (13,3%)	0,09
4*/7*	1 (2,9%)	1 (1,7%)	0,69
Acetiladores lentos	23 (65,7%)	36 (60%)	0,58
5*/5*	3 (8,6%)	5 (8,3%)	0,61
5*/6*	12 (34,3%)	22 (36,7%)	0,81
5*/7*	1 (2,9%)	4 (6,7%)	0,42
6*/6*	4 (11,1%)	2 (3,3%)	0,11
6*/7*	3 (8,6%)	0	0,02
7*/7*	0	0	-

Distribución de los polimorfismos del NAT2 en casos y controles expresados como frecuencia absoluta y los porcentajes (entre paréntesis).

De los pacientes que desarrollaron hepatotoxicidad el genotipo acetilador lento estuvo presente en el 53,3% de las hepatotoxicidades leves, el 78,6% de las moderadas y en el 66,7% de las graves, por lo que no se observó ninguna relación significativa entre el genotipo acetilador lento y la gravedad de la hepatotoxicidad.

IV. 3. POLIMORFISMOS DEL GEN *GST*: *GSTM1* Y *GSTT1*.

Los polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1* fueron determinados en los 95 pacientes. La frecuencia global del polimorfismo *GSTM1* nulo fue del 38,9% y del *GSTT1* del 34,7%. En el 13,7% de los sujetos se encontraron ambos polimorfismos nulos en combinación.

El genotipo *GSTM1* nulo se encontró en 12 (34,3%) casos y en 25 (41,7%) controles, sin diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,47$).

El polimorfismo *GSTT1* nulo fue más frecuente en los pacientes que desarrollaron hepatotoxicidad en comparación con los que no desarrollaron esta complicación (48,6% vs. 26,7%; OR= 2,6; IC 95% 1,08-6,2; $p = 0,03$).

La presencia de ambos genotipos nulos *GSTM1* y *T1* se encontró en 7 (20%) casos y 6 (10%) controles, diferencia no significativa (Tabla 17).

Dentro de los 12 casos con *GSTM1* nulo, seis (50%) presentaron hepatotoxicidad leve, cinco (41,7%) moderada y 1 grave. En el caso de los pacientes pertenecientes al grupo de los casos con *GSTT1* nulo, la gravedad de la hepatotoxicidad fue leve y moderada en 6 (35,3%) pacientes en cada grupo, y grave en 5 (29,4%) pacientes.

Tabla 17. Polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1*.

GENOTIPOS	CASOS	CONTROLES	p
	n = 35	n = 60	
<i>GSTM1</i> nulo	12 (34,3%)	25 (41,7%)	0,47
<i>GSTT1</i> nulo	17 (48,6%)	16 (26,7%)	0,03
<i>GSTM1</i> y <i>T1</i> nulos	7 (20%)	6 (10%)	0,17

Distribución genotípica de los polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1* en casos y controles expresados como frecuencia absoluta y los porcentajes (entre paréntesis).

Encontramos una relación entre el riesgo de hepatotoxicidad grave y la presencia del polimorfismo nulo *GSTT1* de modo que, de los 6 pacientes que desarrollaron hepatotoxicidad grave, en 5 (83,3%) se encontró dicho polimorfismo *GSTT1* nulo ($p= 0,08$). Además, el pico máximo de ALT alcanzado en los pacientes que desarrollaron hepatotoxicidad fue mayor en los portadores del polimorfismo *GSTT1* nulo en comparación con los no portadores del mismo, 342 UI/L (RIQ 167-755) vs. 216 UI/L (RIQ 150-271), aunque sin alcanzar significación estadística ($p= 0,07$).

IV. 4. POLIMORFISMOS DEL GEN *CYP2E1*:

El análisis de los polimorfismos del gen *CYP2E1* se realizó en los 35 casos y en 56 controles. El polimorfismo *c2* se encontró en 10 (11%) pacientes, tres pertenecientes al grupo de los pacientes que desarrollaron hepatotoxicidad y 7 al grupo de los controles. La presencia del polimorfismo *c2* se encontró en todas las ocasiones en heterocigosis con *c1*. Así pues, la presencia del polimorfismo de *c2* en homocigosis (*c2/c2*) no se encontró en ningún sujeto.

El genotipo *c1/c1* se observó en 32 (91,4%) casos frente a 49 (87,5%) controles. El genotipo *c1/c2* fue más frecuente en los controles que en los casos (12,5% vs. 8,6%) aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,56$) (Tabla 18).

En cuanto a su posible relación con la gravedad de la hepatotoxicidad, encontramos la presencia del genotipo *c1/c2* en 3 casos de hepatotoxicidad leve; el resto de los casos de hepatotoxicidad en los que se estudió el *CYP2E1* (32) el genotipo hallado fue el *c1/c1*. No se encontraron diferencias estadísticas en la gravedad de la hepatotoxicidad entre ambos genotipos *c1/c2* y *c1/c1*;

Tabla 18. Polimorfismos del gen *CYP2E1* y su relación con la hepatotoxicidad.

GENOTIPO	CASOS <i>n</i> = 35	CONTROLES <i>n</i> = 56
<i>c1/c1</i>	32 (91,4%)	49 (87,5%)*
<i>c1/c2</i>	3 (8,6%)	7 (12,5%)*
<i>c2/c2</i>	0	0

Distribución genotípica de los polimorfismos *c1* y *c2* en casos y controles expresados como frecuencia absoluta y los porcentajes (entre paréntesis).

* $p=0,73$.

IV. 5. RIESGO DE HEPATOTOXICIDAD ASOCIADO A LA PRESENCIA DE VARIOS POLIMORFISMOS.

Estudiamos la relación entre el riesgo de HFAT y la combinación de varios polimorfismos creando las variables correspondientes. Los polimorfismos nulos *GSTT1* y *GSTM1* se asociaron a los polimorfismos acetiladores lentos del *NAT2* y al genotipo *c1/c1* del *CYP2E1* en 10 (26,6%) casos de hepatotoxicidad y en 12 (21,4%) controles sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,46$). La asociación entre el polimorfismo *GSTT1* y los genotipos acetiladores lentos se observó en 11 (31,4%) casos y 12 (20%) controles, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,22$). Su asociación con el genotipo *c1/c1* del *CYP2E1* se encontró en 10 (28,6%) casos y en 8 (14,3%) controles, también sin diferencias significativas ($p=0,11$). Tampoco observamos ninguna relación entre el resto de las combinaciones de los polimorfismos de los genes estudiados y el riesgo de HFAT. Dichas combinaciones de polimorfismos tampoco se relacionaron de forma estadísticamente significativa con la gravedad de la hepatotoxicidad.

V. Discusión

V. DISCUSIÓN.

Los resultados de nuestro análisis del papel de varios de los polimorfismos genéticos de las enzimas implicadas en el metabolismo de los FAT en población de ascendencia caucásica nos indican una posible relación entre el riesgo de hepatotoxicidad y el polimorfismo *GSTT1* nulo, no solamente en el riesgo de hepatotoxicidad, sino también en la gravedad de la misma. Sin embargo, no hemos podido demostrar ninguna relación entre el riesgo de hepatotoxicidad y los restantes polimorfismos genéticos estudiados.

Los efectos secundarios de los FAT constituyen un problema importante que deterioran la calidad de vida del paciente y que puede dar lugar a una disminución de la adherencia al tratamiento antituberculoso con el consiguiente peligro de aparición de multirresistencias. El estudio de determinados factores que puedan ser utilizados para prevenir su aparición es, por tanto, uno de los objetivos prioritarios de la investigación en TB (12).

La HFAT es una entidad compleja que puede ser producida por diferentes mecanismos siendo el más importante la alteración de las vías metabólicas celulares responsables del equilibrio entre la producción de hepatotoxinas (reacciones de acetilación e hidroxilación) y su detoxificación en el hígado (reacciones de acetilación y conjugación intracelular). Se han descrito muchos factores de riesgo para el desarrollo de HFAT así como su influencia en la gravedad de la misma, siendo los más importantes la edad avanzada, la existencia de hepatopatías crónicas o alteraciones en las pruebas de función hepática previas al tratamiento, el alcoholismo crónico, la desnutrición y el uso concomitante de otros fármacos. También se han identificado factores de riesgo genéticos que podrían predisponer a HFAT (12).

Uno de los principales motivos de controversia en los estudios de los factores de riesgo de HFAT ha sido la definición de la misma. Existen trabajos que utilizan un punto de corte bajo (elevaciones de las transaminasas por encima de 2 veces los LSN) a pesar de que las elevaciones de transaminasas por debajo de 3 veces los LSN se consideran elevaciones leves con un pronóstico favorable (12). También existen estudios en los que se utilizan puntos de corte elevados (por encima de 5 veces los LSN) debido a la poca repercusión clínica y patológica que suponen las elevaciones que no superen estos límites. Este hecho, puede constituir una limitación a la hora de interpretar los diferentes estudios. En nuestro trabajo, definimos HFAT como elevaciones de las transaminasas por encima de 3 veces los LSN de acuerdo con la OMS y el reciente consenso sobre HFAT de la ATS. La población incluida en el estudio está constituida por mujeres en su mayoría, de edad joven y con un IMC adecuado, sin diferencias entre casos y controles. Se excluyeron además otros factores de riesgo conocidos de HFAT que podrían actuar como factores de confusión.

El mecanismo patogénico por el que dichos factores incrementan el riesgo de HFAT no siempre está bien establecido, como en el caso de la edad, el sexo y el estado nutricional, sin embargo, si lo está en el caso de otros factores como la hepatopatía crónica, toma concomitante de medicación hepatotóxica o alcohol o la elevación basal de los niveles de transaminasas séricas (12).

El metabolismo hepático de los FAT es, en múltiples aspectos, desconocido. Las enzimas implicados en el metabolismo de dichos fármacos pueden determinar un aumento de susceptibilidad al desarrollo de HFAT

cuando, como consecuencia de su actividad, se produce un desequilibrio entre la producción y la degradación de sustancias hepatotóxicas. El acúmulo de dichas sustancias sería pues el mecanismo patogénico que explicaría la influencia de la actividad de estas enzimas en el riesgo de HFAT. Dicha actividad enzimática parece estar modulada por factores externos o ambientales y por factores internos dependientes del huésped. Dentro de los factores internos se encuentran los genéticos, concretamente, ciertos polimorfismos genéticos pueden tener una influencia en su actividad y nivel de expresión afectando a la susceptibilidad y gravedad de la HFAT. Por lo tanto, parece justificado el hecho de que se hayan realizado estudios cuyo objetivo principal es determinar la relación entre ciertos polimorfismos genéticos de los principales enzimas encargados de la detoxificación hepática de la H y el riesgo de HFAT (50,273). Los estudios al respecto han evaluado ciertos polimorfismos genéticos del *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2*, *CYP2E1* y *MnSOD* (37-39,43-49). En estos trabajos, la variante polimórfica del gen determina un cambio en la actividad de la enzima que teóricamente modifica el riesgo de HFAT. La mayor parte de dichas investigaciones fueron realizadas en poblaciones asiáticas. La originalidad de nuestro estudio reside en el hecho de que no exista ningún estudio previo en la literatura que relacione factores genéticos con el riesgo de HFAT en población caucásica.

V.1. POLIMORFISMOS DEL GEN NAT2.

Debido a que el grupo enzimático del NAT2 es uno de los principales implicados en la detoxificación de la H varios estudios han intentado encontrar una relación entre el fenotipo acetilador y el riesgo de HFAT con resultados controvertidos (12,37-39,43-46,49,50,273). Dichas diferencias pueden tener su explicación en su diferente metodología tanto en la inclusión de sujetos con diferentes regimenes de tratamiento como en la imprecisión del método de medida del estatus acetilador. El fenotipo acetilador puede estar influenciado por múltiples factores que pueden actuar como factores de confusión, como la edad, el sexo, la dieta, el consumo de alcohol, los contaminantes ambientales, la función hepática, el uso concomitante de otras drogas y la presencia de comorbilidad (108). La determinación genotípica de variantes alélicas que determinan velocidades de acetilación lentas constituye una opción de estudio de la relación entre la velocidad de acetilación del NAT2 y el riesgo de HFAT en la que se evita la imprecisión de la mayoría de los métodos de medida fenotípicos del estatus acetilador. Concretamente, la genotipificación mediante PCR-RFLP es un método poco invasivo, de bajo coste, de confianza, reproducible y aplicable a una gran masa poblacional. El conocimiento *a priori* de estos genotipos acetiladores lentos se basa en estudios *in vivo* de la actividad del enzima. De las 36 variantes alélicas reportadas para el NAT2, cinco se han demostrado determinantes de un fenotipo acetilador lento con una frecuencia en la población general mayor del 1% (Tabla 3). La disminución de la actividad acetiladora del enzima varía según la combinación alélica (117). Tal y como se explicó en la introducción dichos alelos son el *5, *6, *7,*14 y *17. En la mayoría de los estudios en los que se analizó la relación entre los

genotipos acetiladores lentos del *NAT2* y el riesgo de HFAT los genotipos del *NAT2* definidos como lentos fueron combinaciones de los alelos *5, *6 y *7. Los genotipos en los que no se demostró ninguno de dichos alelos se clasificaron como rápidos, definidos como combinaciones alélicas del alelo *4 o “wildtype”. En nuestro estudio, la determinación de los genotipos lentos también se basó en la identificación de estos alelos y la ausencia de dichas variantes polimórficas se interpretó como la presencia de un genotipo lento. Este hecho constituye una limitación en la interpretación de los resultados ya que pueden existir variantes alélicas del *NAT2* menos frecuentes que determinan un fenotipo acetilador lento, de modo que individuos con genotipos acetiladores lentos serían identificados falsamente como rápidos.

Otro hecho controvertido en el análisis de los polimorfismos lentos del *NAT2* y su relación con el riesgo de HFAT es que la determinación del alelo *5 definido fundamentalmente por la sustitución T341C se basó en la pérdida de la diana de restricción de la endonucleasa de restricción *KpnI*, enzima que detecta la sustitución C481T. Esto se debe a que, en la mayoría de las ocasiones, C481T se asocia a T341C y viceversa. Sin embargo, las variantes del alelo *5C, *5D, *5E y *5J, no se caracterizan por la presencia de la mutación C481T (Tabla 3). Tal y como apuntan Cascorbi *et al* la clásica determinación de los alelos lentos *5 (C481), *6 (G590A) y *7 (G857A) mediante PCR-RFLP puede dar lugar a una infraestimación de los genotipos acetiladores lentos si sólo se consideran dichas mutaciones (117). Sin embargo, los alelos lentos *5, *6 y *7 son los que se encuentran más frecuentemente en caucásicos (139,152) por lo que, en nuestra población, la

posibilidad de falsos acetiladores rápidos parece menor que para otras poblaciones.

Nuestra investigación en población de origen caucásico no ha demostrado ninguna asociación significativa entre el riesgo de HFAT y los genotipos acetiladores lentos del *NAT2*. Sin embargo, en la revisión de la literatura se encuentran varios trabajos que manifiestan dicha asociación en otro tipo de poblaciones. Uno de los primeros estudios de la relación entre el genotipo *NAT2* y la incidencia de HFAT fue el realizado por Ohno *et al*, en una cohorte de pacientes enfermos de TB procedentes de Japón, sin otros factores de riesgo conocidos de hepatotoxicidad (39). Los pacientes fueron clasificados en 3 grupos según su genotipo acetilador rápido, intermedio y lento, y seguidos mediante controles clínicos y analíticos de transaminasas. Los alelos lentos determinados fueron el *5B, *6A y *7B. Los genotipos lentos fueron el resultado de las combinaciones de dichos alelos, los intermedios fueron los heterocigóticos con el alelo *4 y los rápidos los homocigóticos para el alelo *4. La hepatotoxicidad fue definida como el incremento de AST y/o ALT mayor de 2 veces los LSN definidos como 31 UI/L para el AST y 34 UI/L para el ALT. De un total de 77 pacientes incluidos, catorce (18,2%) desarrollaron hepatotoxicidad. Según su estratificación en función del genotipo acetilador, solamente 7 (9,1%) pacientes presentaban un genotipo acetilador lento y todos (100%) los integrantes de este grupo desarrollaron HFAT. Dentro de los 42 (54,5%) pacientes acetiladores intermedios y 28 (36,4%) rápidos, seis (14,3%) y 1 (3,5%) respectivamente desarrollaron hepatotoxicidad, sugiriendo que, el riesgo de la misma, era significativamente mayor en los grupos de pacientes con genotipos acetiladores lentos e intermedios (39). Sin embargo, dado que la

media (\pm Desviación Estándar [DE]) de los picos máximos de transaminasas (AST y ALT) alcanzados fue inferior a 120 UI/L si aplicáramos la definición de HFAT establecida por la OMS (22) no existiría ningún caso de HFAT. Así pues, más que casos de hepatotoxicidad deberían de ser definidos como elevaciones leves de transaminasas, alteración que entraría dentro del marco del síndrome clínico de respuesta hepática adaptativa. En nuestro estudio, no hemos valorado el riesgo de elevaciones leves de transaminasas en función del genotipo acetilador, debido a su buen pronóstico y, por lo tanto, escasa relevancia y potencial aplicabilidad clínica de los resultados.

En población procedente de Japón se evaluó la influencia del genotipo acetilador lento en la incidencia de efectos adversos al tratamiento con H (273). Dentro de los efectos estudiados no se valoró la frecuencia de HFAT sino la aparición de náuseas, vómitos, fiebre, alteraciones visuales y neuritis periférica, efectos secundarios cuyo mecanismo es desconocido, aunque se postula que un descenso del aclaramiento de la H puede favorecer su aparición. Los genotipos lentos investigados fueron combinaciones de los alelos *5, 6* y *7. Se incluyeron 102 pacientes a tratamiento con H, sólo o en combinación con R. Los sujetos fueron designados en grupos de acuerdo con sus genotipos (lento, intermedio y rápido). El porcentaje de pacientes que desarrollaron dichos efectos adversos fue del 5,2% siendo significativamente mayor en los acetiladores lentos frente a los otros 2 grupos. Estos autores hallaron una correlación entre el riesgo de varios efectos secundarios a la H y el genotipo acetilador lento potencialmente explicable por un mayor acúmulo de metabolitos tóxicos derivados del metabolismo de la H. Aunque en este estudio no se evaluó específicamente el riesgo de hepatotoxicidad, parece que el

acúmulo de metabolitos de H es modulado por la presencia de un genotipo acetilador lento por lo que, dado que la aparición de hepatotoxicidad responde al mismo mecanismo, es posible que el genotipo acetilador del *NAT2* también module un mayor riesgo de hepatotoxicidad secundaria a H, tal y como observaron Ohno *et al* (39). El trabajo de Higuchi *et al* llevado a cabo también en Japón, en el que se estudió la asociación entre determinados polimorfismos del *NAT2* y el riesgo de HFAT, rash cutáneo y eosinofilia también se observó una relación significativa (44). Se incluyeron 100 pacientes a tratamiento con pautas que incluían H y R de los cuales el 50% desarrolló alguno de estos efectos secundarios y concretamente 18 (18%) presentaron HFAT. De los 4 polimorfismos del *NAT2* determinados la presencia del *6A se asoció con un mayor riesgo de HFAT ($p=0,001$). Además el genotipo *6A/*7B se encontró el 16,6% de los casos frente al 2,4% de los controles ($p=0,029$) (44). Al igual que en el estudio de Ohno *et al* (39), la frecuencia de HFAT fue elevada y la definición de la misma también utiliza un punto de corte bajo en el nivel de transaminasas (elevación 2 veces los LSN) por lo que, al tratarse en muchas ocasiones de elevaciones leves, el conocimiento *a priori* de posibles factores de riesgo tendría una menor relevancia clínica. Al igual que en nuestro estudio, el genotipo del *NAT2* 6*/7* parece estar particularmente asociado al riesgo de HFAT. En este trabajo no se encontró ninguna asociación significativa entre el riesgo de otros efectos secundarios de la H y los polimorfismos del *NAT2* (44).

Estos estudios ponen de manifiesto que en población japonesa determinados polimorfismos del *NAT2* podrían ser biomarcadores predictores de HFAT y ser utilizados para realizar un tratamiento antituberculoso más individualizado (39,44,273).

Huang *et al* estudiaron los genotipos lentos del *NAT2* y su relación con el riesgo de HFAT en población china procedente de Taiwán, en dos estudios, el primero en el que sólo se evaluó el riesgo de HFAT según el genotipo acetilador y el segundo en el que se estudió en conjunto con el riesgo asociado a los polimorfismos del *CYP2E1* (46,47). En su primer estudio Huang *et al* incluyeron 224 enfermos de TB, bajo tratamiento con, al menos, H, R y Z y sin factores de riesgo conocidos de HFAT (46). Se consideró HFAT según el nivel de transaminasas alcanzado, elevaciones de AST y/o ALT > 2 veces los LSN con aumento de la bilirrubina o elevaciones de AST y/o ALT > 3 veces los LSN. Al igual que en los estudios anteriores, los alelos responsables de los genotipos lentos fueron las combinaciones de *5, 6* y *7. Sin embargo, en este estudio la ausencia de dichos alelos (definida como alelo *4 o “wild-type”) tanto en homocigosis como en heterocigosis fue definida como genotipo acetilador rápido. De los 224 pacientes, treinta y tres (14,7%) desarrollaron HFAT, de los que 19 (18%) fueron elevaciones < 3 veces los LSN y 14 (6,3%) elevaciones > 3 veces los LSN. De los 224 pacientes, ciento setenta y uno (76,3%) fueron acetiladores rápidos y 53 (23,5%) acetiladores lentos. Huang *et al* encontraron que el riesgo de HFAT asociado a los genotipos acetiladores lentos era significativamente mayor que en los genotipos rápidos (26,4% vs. 11,1%; OR= 2,87; IC 95% 1,3-6,2; p= 0,013), siendo los genotipos *6/*6 y 6*/7* los más frecuentemente relacionados con daño hepático. Además, los acetiladores lentos tuvieron un aumento máximo medio de ALT y AST significativamente mayor que los acetiladores rápidos, por lo que el estatus acetilador no solamente se relacionó con la incidencia de HFAT, sino que también se relacionó con la gravedad de la misma (46). Dichos hallazgos apoyan la

creencia de que la acetilación juega un importante papel en la patogénesis de la HFAT. En un segundo estudio similar más amplio con 318 pacientes se corroboran dichos hallazgos (47). Al igual que en población japonesa, la frecuencia de los genotipos acetiladores lentos en chinos es inferior que en caucásicos, motivo por el que la posibilidad de encontrar diferencias en nuestra población es menor para el mismo tamaño muestral.

En el reciente estudio de Cho *et al* llevado a cabo en población coreana en el que se incluyeron 132 enfermos de TB también se demostró un incremento del riesgo de HFAT asociado al genotipo *NAT2* acetilador lento (45). Al igual que en el estudio de Ohno *et al* (39) y Higuchi *et al* (44) la definición de HFAT analítica se basó en un incremento de los valores basales de ALT > 2 veces los LSN. El método de medida de los genotipos lentos del *NAT2* fue la secuenciación. La presencia de cualquier alelo mutante en combinación se definió como acetilador lento, mientras que los acetiladores rápidos poseían el alelo *4 o “wild-type” de forma hetero u homocigótica. De los 132 pacientes seguidos de forma prospectiva, dieciocho (13,6%) desarrollaron HFAT. De los 19 pacientes con genotipo acetilador lento, siete (36,8%) desarrollaron HFAT frente a 11 (9,7%) dentro del grupo de 113 pacientes con genotipo acetilador rápido. El riesgo de HFAT fue significativamente mayor en los acetiladores lentos comparado con los rápidos (OR= 5,41; IC 95% 1,7-16,5; p= 0,005) (45). Los resultados de este estudio se correlacionan con los obtenidos en población procedente de Japón y China (39,44,46,47). La definición de hepatotoxicidad es menos estricta que en otros trabajos y, por lo tanto, baja para definir hepatotoxicidad clínica evidente. Dichos autores consideran que este criterio es clínicamente útil para encontrar alteraciones

hepáticas de forma precoz y prevenir el desarrollo de HFAT. Una vez más, las discrepancias entre estos resultados y los obtenidos en nuestro estudio podrían ser explicados por la diferente distribución genotípica del *NAT2*, así como la diferente definición de HFAT.

En población de ascendencia turca también se observó una relación significativa entre la presencia de polimorfismos lentos del *NAT2* y el riesgo de HFAT (43). En este estudio en el que se siguieron de forma prospectiva 100 enfermos de TB, el polimorfismo *NAT2* 6*A se encontró en el 70% de los casos frente al 41% de los controles ($p= 0,007$). Además, la combinación de los alelos lentos 5*A, 6*A y 7*A/B también fue mayor en los enfermos que desarrollaron HFAT. En este estudio, llama la atención la baja frecuencia de controles con un genotipo acetilador lento (27,1%), lo cual se aproxima más a las frecuencias reportadas para poblaciones asiáticas que para europeas. En el seguimiento no se realizó una monitorización analítica, de modo que únicamente se realizaban transaminasas séricas en los casos con posibles síntomas de hepatotoxicidad. Por lo tanto, es posible que en la población control se hayan pasado por alto pacientes que desarrollaron HFAT sin clínica de la misma. Otro hecho que sorprende, es la elevada frecuencia de HFAT (30%), teniendo en cuenta además que el diagnóstico de la misma se basa en la presencia de síntomas y que se trata de enfermos sin otros factores de riesgo de HFAT (43).

Estos estudios demuestran una asociación entre ciertos polimorfismos del *NAT2* y el riesgo de HFAT, hallazgo que no se reproduce en nuestra población al igual que tampoco parece que exista una asociación entre el genotipo acetilador lento y el pico máximo de transaminasas alcanzado, es

decir la gravedad de la HFAT. Así pues, en base a nuestros hallazgos no podemos apoyar la hipótesis de que las reacciones de acetilación jueguen un papel importante en la patogénesis de la HFAT. Únicamente el genotipo 6*7* podría ser un factor de riesgo, para lo cual dicho hallazgo debería de replicarse en otros estudios en poblaciones de similares características. Es posible que en población caucásica la importancia de la enzima NAT2 en las reacciones de degradación de la H sea menor que en población de origen chino, japonés y coreano o quizás en nuestra población, la mayor frecuencia de acetiladores lentos se haya compensado con un mayor desarrollo de otros sistemas enzimáticos encargados de la degradación de hepatotoxinas.

Otros estudios realizados en otras poblaciones tampoco han encontrado ninguna relación entre el riesgo de HFAT y el hecho de poseer un genotipo acetilador NAT2 lento. En un trabajo reciente realizado en población cosmopolita residente en Europa de varias ascendencias (caucásicos, hispanos, africanos, sudamericanos y asiáticos) en el que se investiga la asociación de los genotipos lentos del NAT2 con el riesgo de hepatotoxicidad en pacientes a tratamiento con H por TITL, los autores determinan que, tanto el riesgo de elevación leve de transaminasas como de hepatotoxicidad en la cohorte de pacientes estudiada (n= 103) es independiente del genotipo acetilador (37). Completaron el estudio 89 pacientes, de los cuales no se especificó si se excluyeron aquellos con otros factores de riesgo conocidos de HFAT. El análisis de los genotipos lentos del NAT2 se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real (Light Cycler), siendo analizados los polimorfismos *5A (C481T), *6A (G590A), *7A/B (G857A) y 14A (G19A). Los genotipos se determinaron al final de cada ciclo de amplificación. Siguiendo la definición de

HFAT de la ATS, un total de 8 (9%) pacientes desarrollaron hepatotoxicidad y 26 (29%) experimentaron una elevación asintomática de las transaminasas. El genotipo *NAT2* rápido, definido como ausencia de los alelos lentos estudiados, se encontró en 9 (10%) pacientes, su ausencia heterocigótica definida como genotipo acetilador intermedio se observó en 45 (51%) pacientes y su presencia en homocigosis o en combinación, definida como genotipo acetilador lento, se encontró en 35 (39%) pacientes (37). Estos hallazgos nos indican una mayor presencia de acetiladores lentos en comparación con los anteriores estudios reportados aunque menor frecuencia en comparación con nuestro estudio. Este trabajo pone de manifiesto la diferente distribución genotípica entre europeos y asiáticos. La presencia de menos acetiladores lentos de los esperados (50-70% en caucásicos) se debe al origen multirracial de la población, cuya distribución fue 43% caucásicos, 9% hispanos, 35% africanos, 17% sudamericanos, 6% asiáticos y 1% de Oriente Medio (37). Otro factor a tener en cuenta es que, en este estudio, los pacientes tomaban únicamente H indicada para TITL, mientras que en los demás estudios, incluido el nuestro, tomaban H en combinación con R y Z. Se desconoce la posible influencia de la combinación de dichos fármacos en la actividad del *NAT2*, aunque si se sabe que su combinación aumenta la incidencia de HFAT a un 35% (12).

Roy *et al* estudiaron la asociación de los polimorfismos lentos del *NAT2* en niños de origen hindú (38). Incluyeron de forma prospectiva 111 niños diagnosticados de TB y tratados con pautas que incluían, al menos, H, R y Z. De los 109 pacientes que completaron el estudio 8 (7%) desarrollaron HFAT, cuya definición no es concretada en la metodología del estudio. Los polimorfismos del *NAT2* determinados fueron el *5, *6 y *7 mediante PCR-

RFLP. La proporción de acetiladores lentos fue similar en los pacientes que desarrollaron HFAT en comparación con los pacientes que no presentaron esta complicación (63% vs. 56%). Por lo tanto, en este estudio no se demuestra un aumento del riesgo de HFAT asociado al genotipo acetilador del *NAT2* (38). Hemos de tener en cuenta que la incidencia de genotipos acetiladores lentos en población hindú según estudios en población control es del 56%, superior a la reportada en población de origen chino, coreano y japonés (152). Una posible explicación de la no observación de diferencias en el riesgo de HFAT en base al genotipo acetilador lento podría ser el tamaño muestral así como las diferencias en la edad de los pacientes. El hecho de no disponer de una definición de HFAT en la metodología dificulta el poder realizar comparaciones de los resultados con otros estudios. En otro trabajo del mismo grupo en el que además estudiaron los polimorfismos *GSTM1* y *GSTT1* nulos en el que se incluyeron individuos adultos, tampoco observaron ninguna relación entre el riesgo de HFAT y los polimorfismos lentos del *NAT2* (49). En dicho estudio el tamaño muestral fue muy escaso, 33 casos y 33 controles lo cual constituye una seria limitación (49).

En nuestro estudio en el que incluimos 95 pacientes caucásicos del área sur de Galicia no hemos observado diferencias en el riesgo de HFAT asociadas al genotipo acetilador ni una mayor elevación máxima de AST y ALT en los casos de hepatotoxicidad con genotipos acetiladores lentos. Si observamos que el genotipo *6*/7** se encontró solamente en 3 pacientes que desarrollaron HFAT por lo que, en nuestra población podría ser un factor de riesgo de la misma.

A pesar de la dificultad para realizar un cálculo del tamaño muestral necesario debido a la no existencia de estudios en población de similares características a la nuestra, llevamos a cabo un cálculo aproximado tomando como referencia los estudios reportados utilizando el programa GRANMO 5,2 (IMIM, Barcelona). Así pues, aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral, para detectar una OR mínima de 4, asumiendo una tasa de expuestos en el grupo control de 0,6 y con una proporción caso:control de 1:2 se precisarían 40 casos y 80 controles. En base a este cálculo nuestro tamaño muestral puede considerarse insuficiente, aunque se acerca al requerido, por lo que es poco probable que la ausencia de diferencias sea debida a este motivo, ya que ni siquiera hemos observado una tendencia. Sin embargo, en cuanto al polimorfismo 6*7* y el mayor riesgo de HFAT quizás un mayor número de casos y controles incluidos disminuiría el posible error aleatorio.

Podemos resumir que los hallazgos procedentes de los diferentes estudios demuestran un aumento significativo de la frecuencia y gravedad de la hepatotoxicidad en relación con el hecho de poseer un genotipo *NAT2* lento en poblaciones de origen chino, japonés, coreano y turco (39,43-46,50,273). Sin embargo, los genotipos lentos del *NAT2* no han demostrado predisponer a HFAT en nuestra población de origen caucásico procedente del área sur de Galicia, ni en poblaciones de otros orígenes, donde la frecuencia de genotipos acetiladores lentos en población control es superior al 50% (39,43-46,50,273). Una posible explicación a dichos hallazgos es la existencia de vías alternativas de detoxificación tanto de la H como de sus metabolitos en este tipo de poblaciones.

V. 2. POLIMORFISMOS DEL GEN GST.

A pesar de la relevancia de los enzimas GST en los procesos de detoxificación, la delección genética de dos de sus isoenzimas más relevantes, el GSTM1 y el GSTT1, se encuentra en un porcentaje elevado de la población (170). La importancia de dichos polimorfismos nulos en la susceptibilidad a desarrollar HFAT ha sido escasamente estudiada a pesar de que ambos enzimas parecen tener un importante papel en la detoxificación de los metabolitos tóxicos derivados del metabolismo de la H (12,28,50,170,273). La frecuencia de dichos polimorfismos en población control varía en función de las características étnicas de la población estudiada (152,170,273). En nuestro estudio la frecuencia obtenida de ambos polimorfismos nulos *GSTM1* y *GSTT1* es similar a la reportada.

A pesar de la potencial relevancia de ambos polimorfismos nulos en el riesgo de HFAT, solamente existen 2 estudios al respecto y ambos fueron llevados a cabo en población no caucásica (48,49). El presente trabajo es el primer estudio que evalúa el riesgo de HFAT en función de los polimorfismos *GSTM1* y *GSTT1* nulos en población caucásica.

En el primer estudio al respecto realizado por Roy *et al* en población hindú, se incluyeron 66 enfermos de TB, 33 casos de HFAT y 33 controles sin evidencia de esta complicación (49). Observaron que 17 (52%) casos y 8 (24%) controles presentaban el genotipo nulo *GSTM1* (OR= 2,12; IC 95% 1,2-3,1; $p < 0,05$). Sin embargo, no observaron ninguna relación entre el genotipo nulo *GSTT1* y el riesgo de HFAT (49).

Recientemente Huang *et al* corroboran estos hallazgos en un estudio apareado de casos y controles realizado en población china de Taiwán (48).

Incluyeron 63 casos de HFAT dentro de los que el genotipo nulo *GSTM1* nulo estuvo presente en 42 (66,7%) comparado con su presencia en 29 (46%) controles (OR= 2,23; IC 95% 1,07-4,6; p= 0,03). Tampoco encontraron ninguna relación de riesgo ente el polimorfismo *GSTT1* nulo y el riesgo de HFAT (48).

En nuestro estudio, realizado en población caucásica de nuestra área no hemos encontrado diferencias en el riesgo de HFAT en cuanto a la presencia del polimorfismo nulo *GSTM1*. Sin embargo, la presencia del polimorfismo nulo *GSTT1* en nuestros pacientes incrementa el riesgo de HFAT de forma significativa (OR: 2,6; IC 95% 2,6-6,24; p= 0,03). Además, de los 6 pacientes que habían desarrollado HFAT grave en 5 de ellos estaba presente el polimorfismo *GSTT1* nulo (p= 0,08), por lo que, aunque este resultado sólo muestra una tendencia, el polimorfismo *GSTT1* parece estar relacionado con un mayor riesgo de HFAT y una mayor gravedad de la misma. Estos hallazgos sugieren que las enzimas *GSTT1* pueden jugar un papel más importante en Caucásicos en los procesos de detoxificación que las enzimas *GSTM1*. Aunque existen diferencias importantes en la frecuencia de dichos polimorfismos en las diferentes etnias, no hemos encontrado estudios que muestren diferencias poblacionales en el riesgo de HFAT asociado a ambos polimorfismos *GSTM1* y *GSTM1* nulos.

V. 3. POLIMORFISMOS DEL GEN *CYP2E1*.

Otros enzimas potencialmente implicados en el metabolismo de la H son los *CYP2E1*, fundamentalmente en reacciones metabólicas de tipo I dando lugar a sustancias hepatotóxicas cuyo efecto en el riesgo de HFAT ha sido estudiado en algunas poblaciones (37,38,45,47,50,273).

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias en el riesgo de HFAT en función de la presencia de los polimorfismos *CYP2E1* determinados por la enzima de restricción *RsaI*. Sin embargo, en otros estudios sí se han encontrado diferencias (37,45,47).

En el trabajo realizado por Huang *et al* en 318 pacientes, población en la que también se estudió previamente el *NAT2*, se determinaron los genotipos *c1/c1*, *c1/c2* y *c2/c2* dentro de los que 185 (58,2%), 118 (37,1%) y 15 (4,7%) fueron *c1/c1*, *c1/c2* y *c2/c2* respectivamente (47). El análisis del riesgo de HFAT según la presencia de dichos polimorfismos determinó que en los pacientes con los genotipos *c1/c2* y *c2/c2* el riesgo de HFAT fue menor que en los pacientes con el genotipo *c1/c1* (alelo “wildtype”) (9% vs. 20%; $p=0,009$). Tras ajustar en el análisis multivariante por otros posibles factores de confusión, el genotipo *c1/c1* resultó ser un factor de riesgo independiente de HFAT. En este estudio la frecuencia de *c1/c2* y *c2/c2* conjunta en población control fue del 44,9%, muy superior a la de nuestro estudio en el que el genotipo *c2/c2* no fue encontrado en ningún paciente y la frecuencia del *c1/c2* fue del 12,5%. Así pues, una posible explicación de los diferentes resultados obtenidos podría ser la diferente distribución genotípica. Además, la ausencia de diferencias podría deberse a un tamaño muestral insuficiente dada la baja frecuencia de dicho polimorfismo en población caucásica. Utilizando el

programa GRANMO 5,2 (IMIM, Barcelona) para el cálculo del tamaño muestral para detectar una odds ratio mínima de 2,52, asumiendo que la tasa de expuestos es del 0,04, aceptando un riesgo alfa de 0,05, un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral y con una proporción caso:control 1:2 se precisarían 226 casos y 452 controles. A pesar de que este cálculo no es exacto porque no disponemos de estudios previos en poblaciones similares a la nuestra, parece que una limitación importante de nuestro estudio es el tamaño muestral. Sin embargo, en el estudio de Huang *et al*, encuentran diferencias sin llegar a alcanzar el tamaño muestral calculado, aunque hemos de tener en cuenta que la frecuencia de dicho polimorfismo en asiáticos es mayor (aproximadamente un 7%).

Los hallazgos en población china se reproducen en el estudio de Vuilleumier *et al* llevado a cabo en población de varias etnias pero predominantemente Caucásica (45%), en cuanto a la relación entre la presencia del genotipo *c1/c1* y el riesgo de elevación asintomática de los niveles de transaminasas (37). Además, aunque no se observó una asociación significativa, si se observó una tendencia con el riesgo de HFAT (OR= 5,9; IC 95% 0,6-27; p= 0,13), lo cual sugiere un papel protector del polimorfismo *c2* en comparación con el alelo “wild-type” *c1* (37).

Sin embargo, otros estudios no corroboran estos hallazgos por lo que sus resultados están más en consonancia con los nuestros. Así pues, Cho *et al* en población coreana no encontraron diferencias entre los 3 genotipos *c1/c1*, *c1/c2* y *c2/c2* y el riesgo de HFAT (45). La frecuencia global del alelo *c2* fue del 44,2% y en controles del 35,6% algo más baja que en el estudio de Huang *et al* (45,47). A pesar de que la frecuencia de dicho polimorfismo es mayor en

asiáticos que en caucásicos, el pequeño tamaño muestral de este estudio podría ser una posible explicación al hecho de no haber encontrado diferencias (152,273). Además, el número de casos de HFAT es escaso ya que dicha complicación en pacientes sin factores de riesgo conocidos es infrecuente, lo cual constituye una dificultad a la hora de plantear este tipo de estudios. Roy *et al* en su estudio realizado en niños de origen hindú, al igual que en nuestro trabajo, tampoco encontraron la variante *c2/c2* en ningún niño (38). La presencia del polimorfismo *c2* en heterocigosis (*c1/c2*) se encontró en el 13% de los casos y en el 2% de los controles sin diferencias significativas (38). Hemos de tener en cuenta que, debido a que es un estudio en población pediátrica, sus resultados no son comparables con los estudios en población adulta. En este trabajo se observa una frecuencia del polimorfismo *c2* en población control particularmente baja, por lo que el hecho de no haber encontrado diferencias podría deberse tanto a una diferente distribución genotípica como a un tamaño muestral insuficiente, al igual que en nuestro estudio (38).

A pesar de que en el estudio de Huang *et al* (47), la presencia del polimorfismo *c2* se identificó como un factor protector del desarrollo de HFAT y en el de Vuilleumier *et al* (37) se relacionó con el aumento asintomático de transaminasas y HFAT, la ausencia de otros estudios que ratifiquen estos hallazgos, incluyendo el nuestro, hace que no se pueda establecer el papel de dichos polimorfismos del *CYP2E1* en el riesgo de HFAT. Se precisan estudios en diversas poblaciones que incluyan a un número de sujetos mayor.

V. 4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

V.4.1. DERIVADAS DEL DISEÑO.

Se trata de un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de enfermos de TB expuestos a FAT seguidos a lo largo del tiempo. Los casos son pacientes que desarrollaron HFAT y los controles pacientes que no desarrollaron esta complicación. El tamaño muestral es escaso debido a que, en primer lugar, la frecuencia global de HFAT no es elevada y, en segundo lugar, hemos utilizado estrictos criterios de inclusión para limitar al máximo la presencia de otros posibles factores que podrían ser causantes de HFAT.

Además de los casos de HFAT procedentes de la cohorte de Vigo se incluyeron todos los casos de HFAT diagnosticados en la UTB de Pontevedra desde enero del 2005 hasta agosto del 2006. Este hecho constituye una modificación de la metodología con respecto al proyecto inicial en el que únicamente se contemplaba la inclusión de pacientes pertenecientes a la UTB de Vigo. La justificación de la misma fue ampliar el número de casos de HFAT. Dicha modificación se realizó en enero del 2005, fecha en la que se decidió incluir todos los casos nuevos de HFAT siguiendo el mismo protocolo de controles clínicos y analíticos de la UTB de Vigo.

En este tipo de estudios la elección del individuo como control depende de que éste se encuentre en riesgo, es decir, esté incluido en una cohorte en el momento en que se selecciona el caso (274). Los sujetos de estudio permanecieron en la cohorte durante, al menos, 6 meses. El diseño de casos y controles resulta ideal para el estudio de algunos factores de riesgo genético de HFAT, sobre todo cuando se trata de una enfermedad poco frecuente y el

periodo de exposición en el que se puede producir el evento es prolongado y variable de unos individuos a otros. Sin embargo, tienen limitaciones que hacen que sean susceptibles de sesgos (274). Otra de las limitaciones de los estudios de casos y controles es que no se puede estimar de manera directa las medidas de incidencia o prevalencia que tradicionalmente se obtienen en los estudios de cohortes o transversales (274). Sin embargo, uno de los puntos fuertes del estudio es que, al estar anidado en una cohorte se basa en casos incidentes, y no en casos prevalentes, por lo que algunos de estos sesgos se atenúan. Por parecida razón, el sesgo de recuerdo y el sesgo de procedencia temporal se hacen menos relevantes en la investigación de causalidad. Estos sesgos, además, no son planteables cuando se trata de un genotipo, presente desde el nacimiento.

V. 4. 2. DERIVADAS DEL ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS.

A continuación se exponen las limitaciones en el análisis de cada uno de los genes estudiados.

Gen *NAT2*:

Es importante destacar que no se han realizado todos los polimorfismos determinantes de fenotipos acetiladores lentos, por lo que la simple determinación de los alelos 5*, 6* y 7* puede dar lugar a una infraestimación de los polimorfismos lentos.

Gen *GST*:

La ausencia de diferencias en el caso del *GSTM1* nulo podría ser explicado por un tamaño muestral insuficiente ya que según el cálculo del mismo mediante el programa GRANMO 5,2 (IMIM, Barcelona) aceptando un

riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral para detectar una OR mínima de 2,12 se precisan 98 casos y 196 controles asumiendo que la tasa de expuestos es del 53%. Hemos de tener en cuenta que los datos de OR se han obtenido de los 2 estudios publicados, que fueron realizados en hindús y chinos por lo que al ser diferentes poblaciones no es posible estimar con fiabilidad el tamaño muestral.

Gen *CYP2E1*:

El cálculo de la muestra necesario es muy superior al tamaño muestral del estudio por lo que la ausencia de diferencias podría deberse a un error tipo 2.

Las revisiones recientes indican que el 70-95% de las asociaciones recientes que se publican no se confirman en los estudios posteriores (275). La mayor parte de los diseños de los estudios son de casos y controles, por lo que además de los sesgos conocidos de este tipo de estudios, en el caso de las asociaciones genéticas, se deben de tener en cuenta consideraciones adicionales como que las variantes genéticas difieren en las poblaciones en función de la raza (estratificación de la población). Uno de los problemas más importantes de estos tipos de asociaciones es el gran número de polimorfismos genéticos que pueden estar relacionados con el riesgo de enfermedad, el desarrollo de técnicas con capacidad de detectarlos en una gran cantidad de personas y su aplicabilidad práctica.

En concreto, las conclusiones de nuestro trabajo deben de interpretarse con cautela y confirmarse en estudios más amplios estratificados según etnias.

VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES.

1. La mutación nula *GSTT1* se asoció de forma significativa e independiente con el riesgo de hepatotoxicidad secundaria a fármacos antituberculosos en población caucásica. Parece observarse una tendencia entre la mutación nula *GSTT1* y las formas más graves de hepatotoxicidad. Sin embargo, no se encontró ninguna relación entre la mutación nula *GSTM1* y el riesgo de hepatotoxicidad secundaria a fármacos antituberculosos.

2. No se ha encontrado asociación entre los polimorfismos genéticos acetiladores lentos del *NAT2* y un mayor riesgo de hepatotoxicidad secundaria a fármacos antituberculosos.

3. No se ha encontrado asociación entre el polimorfismo 2 del *CYP2E1* y un menor riesgo de hepatotoxicidad secundaria a fármacos antituberculosos en nuestra población en comparación con el alelo 1.

4. La frecuencia poblacional de los polimorfismos genéticos de los enzimas estudiados son similares a los descritos en otros estudios.

5. El estudio de estos polimorfismos no permite definir las necesidades de controles clínicos y analíticos adecuados para el seguimiento de estos pacientes.

VII. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA:

1. "Basic Facts on TB: Stop TB, fight poverty", The Stop TB Partnership, 24 de marzo de 2002. Disponible en <http://www.stoptb.org>. Consultado el 10 de Noviembre de 2006.
2. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2005. Geneva, World Health Organization. (WHO/HTM/TB/2005.349).
3. Rodríguez Valín E. Situación actual de la tuberculosis en España: incidencia y mortalidad desde 1995. Características de los casos de tuberculosis y meningitis tuberculosa declarados en 2000. SEMERGEN 2002;28:395-400.
4. Cruz-Ferro E, Fernández-Nogueira E. Epidemiology of tuberculosis in Galicia, Spain, 1996-2005. Int J Tuberc Lung Dis 2007;11:1073-1079.
5. Programa Gallego de Prevención y Control de la Tuberculosis. Informe do Programa Galego de Prevención e Control da Tuberculose 1996-2002. Documentos Técnicos de Saúde Pública. Serie B nº 35. Xunta de Galicia, Consellería de Sanidade. Santiago de Compostela, 2003.
6. Kindelan Jaquotot JM, Natera Kindelán C. Tuberculosis en grupos de riesgo. IT del Sistema Nacional de Salud. Volumen 30, Nº 1/2006.
7. Euro TB and the national coordinators for tuberculosis surveillance in the WHO European Region. Surveillance of tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis cases notified in 1998. Disponible en <http://www.ceses.org/eurotb>. Consultado el 10 de Noviembre de 2006.
8. Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003;21:299-308.
9. Grupo de trabajo del área TIR de SEPAR. Tratamiento y retratamiento de la tuberculosis. Arch Bronconeumol 2002;38:441-451.

10. American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention and Infectious Diseases Society of America: Treatment of Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:603-662.
11. American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention and Infectious Diseases Society of America: Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:221-247.
12. American Thoracic Society: Hepatotoxicity of Antituberculosis Therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:935-952.
13. Dirección Xeral de Saúde Pública. Estudio sobre resistencias de *Mycobacterium Tuberculosis* en Galicia e recomendacións de manexo. Documentos Técnicos de Saúde Pública. Serie B nº 34. Xunta de Galicia, Consellería de Sanidade. Santiago de Compostela, 2003
14. Espinal MA, Simonsen L, Laszlo A, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report Nº.2 Prevalence and Trends. World Health Organization (WHO/CDS/TB/2000.278).2000.
15. Perez del Molino Bernal ML, Tunez V, Cruz-Ferro E, Fernandez-Villar A, Vazquez-Gallardo R, Diaz-Cabanela D, Anibarro L, Grupo Gale. Study of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in the region of Galicia, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:1230-1235.
16. Vazquez Gallardo A, Anibarro L, Fernandez-Villar A, Diaz-Cabanela D, Cruz-Ferro E, Perez del Molino ML, Tuñez V, Samper S, Iglesias MJ. Multidrug-resistant tuberculosis in a low-incidence region shows a high rate of transmisión. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:429-435.

17. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001;2:164-168.
18. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998;79:3-29.
19. Shi R, Itagaki N, Sugawara I. Overview of anti-tuberculosis (TB) drugs and their resistance mechanisms. *Mini Rev Med Chem* 2007;7:1177-1185.
20. Mensa J, Gatel L. Guía terapéutica antimicrobiana. Barcelona: Elsevier-Masson, 2007.
21. Navarro VJ, Señor JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006;354:731-739.
22. World Health Organization. WHO ART Adverse Drug Reaction Terminology. Geneva: WHO Collaborating Center for Drug International Monitoring;1979.
23. Arundel C, Lewis JH. Drug-induced liver disease in 2006. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:244-254.
24. Chang CY, Schiano TD. Review article: drug hepatotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:1135-1151.
25. Chitturi S, Farrel G. Drug-induced liver disease. In: Schiff ER, Sorrel MF, Maddrey WC, editors. *Schiff's diseases of the liver*, 9th ed. Philadelphia: Lippincott. Williams & Wilkins;2002,p.1059-1128
26. Larrey D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. *Semin Liver Dis* 2002;22:145-155.
27. Ibañez L, Pérez E, Vidal X, Laporte JR. Grup d'Estudi Multicèntric d'Hepatotoxicitat Aguda de Barcelona. Prospective surveillance of acute

serious liver disease unrelated to infectious, obstructive or metabolic disease: epidemiological and clinical features and exposure to drugs. *J Hepatol* 2002;37:592-600.

28. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, de Lange WC, van der Ven AJ, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:192-202.
29. American Gastroenterological Association medical position statement; evaluation of the liver chemistry tests. *Gastroenterology* 2002;123:1364-1366.
30. Dufour D, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff SB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury I: Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 2000;46:2027-2049.
31. Dufour D, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff SB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury II: Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 2000;46:2050-2068.
32. McNeill L, Allen M, Estrada C, Cook P. Pyrazinamide and rifampin vs isoniazid for the treatment of latent tuberculosis: improved completion rates but more hepatotoxicity. *Chest* 2003;123:102-106.
33. Fernández Villar A. Hepatotoxicidad de la isoniácida en usuarios de drogas. El papel del virus de la hepatitis C. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela 2003.
34. Steele M, Burk RF, DesPrez RM. Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin. A meta-analysis. *Chest* 1991;99:465-471.
35. Vidal Pla R, de Gracia X, Gallego B, Algueró C, Bravo C. Hepatotoxicidad del tratamiento de la tuberculosis. *Med Clin (Barc)* 1991;97:481-485.

36. Nolan C M, Goldberg SV, Buskin SE. Hepatotoxicity associated with isoniazid preventive therapy. A 7-year survey from a public health tuberculosis clinic. JAMA 1999;281:1014-1018.
37. Vulleimer N, Rossier MF, Chiappe A, Degoumois F, Dayer P, Mermillod B, Nicod L, Desmeules J, Hochstrasser D. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. Eur J Clin Pharmacol 2006;6:423-429.
38. Roy B, Ghosh SK, Sutradhar D, Sikdar N, Mazumber S, Barman S. Predisposition of antituberculosis drug induced hepatotoxicity by cytochrome P450 2E1 and haplotype in pediatric patients. J Gastroenterol Hepatol 2006;21:781-786.
39. Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, Ito M, Yamamoto I, Ogura T, Maeda K, Komuta K, Igarashi T, Azuma J. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. Int J Tuberc Lung Disease 2000;4:256-261.
40. Kopanoff DE, Snider DE Jr, Caras GJ. Isoniazid-related hepatitis: a U.S. Public Health Service cooperative surveillance study. Am Rev Respir Dis 1978;117:991-1001.
41. Patel PA, Voigt MD. Prevalence and interaction of hepatitis B and latent tuberculosis in vietnamese immigrants to the United States. Am J Gastroenterol 2002;97:1198-1203.
42. Fountain FF, Tolley E, Chrisman CR, Self TH. A 7-year evaluation from a public health tuberculosis clinic. Chest 2005;128:116-123.

43. Bozok Çetintas V, Erer OF, Kosova B, Ozdemir I, Topçuoglu N, Aktogu S, Eroglu Z. Determining the relation between N-acetyltransferase-2 acetylator phenotype and antituberculosis drug induced hepatitis by molecular biologic tests. *Tuberk Toraks* 2008; 56: 81-86.
44. Higuchi N, Tahara N, Yanagihara K, Fukushima K, Suyama N, Inoue Y, Miyazaki Y, Kobayashi T, Yoshiura K, Nikawa N, Wen CY, Isomoto H, Shikuwa S, Omagari K, Mizuta Y, Kohno S, Tsukamoto K. NAT2 6A, a haplotype of the N-acetyltransferase 2 gene, is an important biomarker for risk of anti-tuberculosis hepatotoxicity in Japanese patients with active tuberculosis. *World J Gastroenterol* 2007;13 :6003-6008.
45. Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, Ki CHS, Nam MH, Kim JW, Lee SY. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2007;87:551-556.
46. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD, Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2002;35:883-888.
47. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD, Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2003;37:924-929.
48. Huang YS, Su WJ, Huang YS, Chen ChY, Chang FY, Lin HCh, Lee SD. Genetic polymorphisms of manganese superoxido dismutase, NAD(P)H: quinine oxido reductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to drug-induced liver injury. *J Hepatol* 2007;47:128-134.

49. Roy B, Chowdhury A, Kundu S, Santra A, Dey B, Chakraborty M, Majumder PP. Increased risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 “null” mutation. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1033-1037.
50. Huang YS. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007;3:1-8.
51. Tanaka E, Terada M, Misawa S. Cytochrome P4502E1. Its clinical and toxicological role. *J Clin Pharm Ther* 2000;25:165-175.
52. Lucas D, Ferrara R, Gonzales E, Albores A, Manno M, Berthou F. Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Toxicol Lett* 2001;124:71-81.
53. Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* 2000;112-113:357-363.
54. Snider DE, Caras G. Isoniazid-associated hepatitis deaths: a review of available information. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:494-497.
55. Sadaphal P, Astemborski J, Graham NMH, Sheely L, Bonds M, Madison A, Vlahov D, Thomas DL, Sterling TR. Isoniazid preventive therapy, hepatitis C virus infection, and hepatotoxicity among injection drug users infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis* 2001;33:1687-1691.
56. Fernández-Villar A, Sopeña B, Vázquez R, Ulloa F, Fluiters E, Mosteiro M, Martínez-Vázquez C, Piñeiro L. Isoniazid hepatotoxicity among drug users. The role of hepatitis C. *Clin Infect Dis* 2003;36:293-298.

57. Fernández-Villar A, Leiro V, Botana M, Sopeña B, Kwon YS, Koh WJ. Hepatitis C virus infection and isoniazid hepatotoxicity. *Chest* 2007;132:736-737.
58. Fernandez-Villar A, Sopeña B, Garcia J, Gimena B, Ulloa F, Botana M, Martinez-Vazquez C. Hepatitis C virus RNA in serum as a risk factor for isoniazid hepatotoxicity. *Infection* 2007;35:295-297.
59. Vanhoof J, Landewe S, Ven Wijngaerden E, Geusens P. High incidence of hepatotoxicity of isoniazid treatment for tuberculosis chemoprophylaxis in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate or sulfasalazine and anti-tumour necrosis factors inhibitors. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1241-1242.
60. Mc-Glynn C, Lustbader E, Sharrar R, Murphy E and London T. Isoniazid prophylaxis in hepatitis B carriers. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:666-668.
61. Hong Kong Chest Service, Tuberculosis Research Centre, Madras, British Medical Research Council. A double-blind placebo-controlled clinical trial of three anti-tuberculosis chemoprophylaxis regimens in patients with silicosis in Hong Kong. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:36-41.
62. Polesky A, Farber H, Gottlieb D, Park H, Levinson S, O'Connell J, McInnis B, Nieves R, Bernardo J. Rifampin preventive therapy for tuberculosis in Boston's homeless. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1473-1477.
63. Menzies D, Dion MJ, Rabinovitch B, Mannix S, Brassard P, Schwartzman K. Treatment completion and costs of a randomized trial of rifampin for 4 months versus isoniazid for 9 months. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:445-449.

64. Lardizabal A, Passamonte M, Kojakali F, Hayden C, Reichman LB. Enhancement of treatment completion for latent tuberculosis infection with 4 months of rifampin. *Chest* 2006;130:1712-1717.
65. Villarino ME, Ridzon R, Weismuller PC, Elcock M, Maxwell RM, Meador J, Smith PJ, Carson ML, Geiter LJ. Rifampin preventive therapy for tuberculosis infection: experience with 157 adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;155:1735-1738.
66. Chen J, Raymond K. Roles of rifampin drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2006;5:3.
67. Caminero JA. ¿Es la quimioprofilaxis una buena estrategia para el control de la tuberculosis?. *Med Clin (Barc)* 2001;116:223-229.
68. Gómez F, Bernal JA, García A. Evaluación y tratamiento de la tuberculosis latente en el adulto. *Med Clin (Barc)* 2001;117:111-114.
69. McNab BD, Marciniuk DD, Alvi RA, Tan L, Hoepfner VH. Twice weekly isoniazid and rifampin treatment of latent tuberculosis infection in canadian plains aborigines. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:989-993.
70. Mwinga AG, Hosp M, Godfrey-Faussett P, Quigley M, Mwaba P, Mugala BN, Nyirenda O, Luo N, Pobee J, Elliott AM. Twice weekly tuberculosis preventive therapy in HIV infection in Zambia. *AIDS* 1998;12:2447-2457.
71. Gordin FM, Chaisson RE, Matts JP, Miller C, de Lourdes Garcia M, Hafner R, Valdespino JL, Coberly J, Schechter M, Klukowicz AJ, Barry MA, O'Brien RJ. An international, randomized trial of rifampin and pyrazinamide versus isoniazid for prevention of tuberculosis in HIV-infected persons. *JAMA* 2000; 283:1445-1450.

72. American Thoracic Society and Center for Disease Control and Prevention. CDC Update: fatal and severe liver injuries associated with rifampin and pyrazinamide for latent tuberculosis infection, and revisions in American Thoracic Society/CDC recommendations: United States, 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1319-1320.
73. Stout JE, Engemann JJ, Cheng AC, Fortenberry ER, Hamilton CD. Safety of 2 months of rifampin and pyrazinamide for treatment of latent tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:824-827.
74. Jasmer RM, Saukkonen JJ, Blumberg HM, Daley CL, Bernardo J, Vittinghoff E, King MD, Kawamura LM, Hopewell PC. Short-course rifampin and pyrazinamide compared with isoniazid for latent tuberculosis infection: a multicenter clinical trial. *Ann Intern Med* 2002;137:640-647.
75. Bock NN, Rogers T, Tapia JR, Heron GD, DeVoe B, Geiter LJ. Acceptability of short-course rifampin and pyrazinamide treatment of latent tuberculosis infection among jail inmates. *Chest* 2001;119:833-837.
76. Lobato MN, Leary L. Adverse drug effects and treatment outcomes related to treatment for latent tuberculosis infection using rifampin and pyrazinamide. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:A713.
77. Youmossian AB, Rochat T, Ketterer JP, Wacker J, Janssens JP. High hepatotoxicity of pyrazinamide and ethambutol for treatment of latent tuberculosis. *Eur Respir J* 2005;26:462-464.
78. Papastavros T, Dolovich LR, Holbrook A, Whitehead L, Loeb M. Adverse events associated with pyrazinamide and levofloxacin in the treatment of latent multidrug-resistant tuberculosis. *CMAJ* 2002;167:131-136.

79. Rizdon R, Meador J, Maxwell R, Higgins K, Weismuller P, Onorato IM. Asyntomatic hepatitis in persons who received alternative preventive therapy with pyrazinamide and ofloxacin. *Clin Infect Dis* 1997;24:1264-1265.
80. Van Hest R, Baars H, Kik S, Van Gerven P, Trompenaars MC, Kalisvaart N, Keizer S, Borgdorff M, Mensen M, Cobolens F. Hepatotoxicity of rifampin-pyrazinamide and isoniazid preventive therapy and tuberculosis treatment. *Clin Infect Dis* 2004;39:488-496.
81. Rivero A, López-Cortés L, Castillo R, Verdejo J, García MA, Martínez-Marcos FJ, Díez F, Escribano JC, Canueto J, Lozano F, Pasquau J, Hernández JJ, Márquez M, Kindelán JM y Grupo Andaluz para el estudio de las Enfermedades Infecciosas (GAEI). Randomized clinical trial investigating three chemoprophylaxis regimens for latent tuberculosis infection in HIV-infected patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25:305-310.
82. Durand F, Jebak G, Pessayre D, Fournier M, Bernau J. Hepatotoxicity of antitubercular treatments. Rationale for monitoring liver status. *Drug Safety* 1996;15:394-405.
83. Sodhi CP, Rana SV, Mehta SK, Vaiphei K, Attari S, Mehta S. Study of oxidative-stress in isoniazid-rifampin induced hepatic injury in young rats. *Drug Chem Toxicol* 1997;20:255-269.
84. Shibata K, Fukuwatari T, Sugimoto E. Effects of dietary pyrazinamide, an antituberculosis agent, on the metabolism of tryptophan to niacin and to tryptophan to serotonin in rats. *Biosci Biochem* 2001;65:1339-1346.
85. Sharma SK. Anti-tuberculosis drugs and hepatotoxicity. *Infect Genet Evol* 2004;4:167-170.

86. Sharma SK, Balamurugan A, Saha PK, Pandey RM, Mehra NK. Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:916-919.
87. Fernández-Villar A, Sopeña B, Fernández-Villar J, Vázquez R, Ulloa F, Leiro V, Mosteiro M, Piñeiro L. The influence of risk factors in the severity of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8:1499-1505.
88. Yew WW, Leung Ch. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology* 2006;11:699-707.
89. Hwang SJ, Wu JC, Lee CN, Yen FS, Lu CL, Lin TP, Lee SD. A prospective clinical study of isoniazid-rifampicin-pyrazinamide liver injury in an area endemic for hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:87-91.
90. Wong WM, Wu PC, Yuen MF, Cheng CC, Yew WW, Wong PC, Tam CM, Leung CC, Lai CL. Antituberculosis drug-related liver dysfunction in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2000;3:201-206.
91. Lee BH, Koh WJ, Choi MS, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon OJ. Inactive hepatitis B surface antigen carrier state and hepatotoxicity during antituberculosis therapy. *Chest* 2005;127:1304-1311.
92. Pan L, Jia ZS, Chen L, Fu EQ, Li GY. Effect of anti-tuberculosis therapy on liver function of pulmonary tuberculosis patients infected with hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2005;11:2518-2521.
93. Ungo J, Jones D, Ashkin D, Hollender ES, Bernstein D, Albanese AP, Pitchenik AE. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. The role of

- hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1871-1876.
94. Kwon YS, Koh WJ, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon J. Hepatitis C virus infection and hepatotoxicity during antituberculosis chemotherapy. *Chest* 2007;131:803-808.
 95. Bénichou C. Criteria for drug-induced liver disorders. Report of an International Consensus Meeting. *J Hepatol* 1990;11:272-276.
 96. Larrey D. Drug-induced liver disorders. *J Hepatol* 2000;32 Supp 1:77-81.
 97. Danan G, Bénichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries. *J Clin Epidemiol* 1993; 46:1323-1330.
 98. Lucena MI, Camargo R, Andrade RJ, Pérez-Sánchez CJ, Sánchez de la Cuesta F. Comparison of two clinical scales for causality assessment in hepatotoxicity. *Hepatology* 2001;33:123-130.
 99. Kaplowitz N. Causality assessment versus guilt-by-association in drug hepatotoxicity. *Hepatology* 2001;33:308-310.
 100. Gourevitch MN, Wasserman W, Panero MS, Selwyn PA. Successful adherence to observed prophylaxis and treatment of tuberculosis among drug users in a methadone program. *J Addict Dis* 1996;15:93-104.
 101. Snyder DC, Paz EA, Mohle-Boetani JC, Fallstad R, Black RL, Chin D. Tuberculosis prevention in methadone maintenance clinics. Effectiveness and cost-effectiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:178-185.

102. Luque J, Herráez A, editor. Biología Molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. 1ª ed. Elsevier Science, España 2002.
103. Hughes HB. On the metabolic fate of isoniazid. J Pharmacol Exp Ther 1953;109:444-452.
104. Grant DM, Beer M, Blum M, Meyer UA. Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of the liver isozymes and expressed products of two cloned genes. Mol Pharmacol 1991;39:184-191.
105. Grant DM, Morike K, Eichelbaum M, Meyer UA. Acetylation pharmacogenetics: the slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine N-acetyltransferase in human liver. J Clin Invest 1990;85:968-972.
106. Deguchi T. Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine N-acetyltransferase of human liver. J Biol Chem 1992;267:18140-18147.
107. Weber WW, Hein DW. N-acetylation pharmacogenetics. Pharmacol review. 1985;35:25-79.
108. Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. Mutat Res 2002;506-507:65-77.
109. Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Johnson VM, Felton JS. Cencer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analyses and implications for research. Carcinogenesis 1995;16:39-52.
110. Dupret JM, Grant DM. Site-directed mutagenesis of recombinant human arylamine N-acetyltransferase expressed in *E Coli*: evidence for direct

- involvement of Cys⁶⁸ in the catalytic mechanism of polymorphic human NAT2. *J Biol Chem* 1992;267:7381-7385.
111. Minchin RF, Reeves PT, Teitel CH, McManus ME, Mojarrabi B, Ilett KF, Kadlubar FF. N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens by human monomorphic and polymorphic acetyltransferases expressed in COS-I cells. *Biophys Res Commun* 1992;185:839-844.
112. Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng W, Ferguson RJ, Grant DM. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* 1993;14:1633-1638.
113. Hein DW, Rustan TD, Ferguson RJ, Doll MA, Gray K. Metabolic activation of aromatic and heterocyclic N-hydroxyarylamine by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. *Arch Toxicol* 1994;68:129-133.
114. Blum M, Grant DM, McBridge W, Heim M, Meyer UA. Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal location and functional expression. *DNA Cell Biol* 1990;9:193-203.
115. Hickman D, Risch A, Buckle V, Spurr N, Jeremiah SJ, McCarthy A, Sim E. Chromosomal location of human genes for arylamine N-acetyltransferase. *Biochem J* 1994;297:441-445.
116. Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Aupret JM, Price-Evans DA, Grant DM, Hein DW, Lin HJ, Meyer UA, Relling MV, Sim E, Suzuki T, Yamazoe Y. Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 1995;5:1-17.
117. Cascorbi I, Brockmoller J, Mrozkiewicz PM, Muller A, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase activity in man. *Drug Metab Rev* 1999;31:489-502.

118. Lin HJ, Han CHY, Lin BK, Hardy S. Slow acetylators mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 asians, blacks, Hispanics and whites: application to metabolic epidemiology. *Am J Hum Genet* 1993;52:827-834.
119. Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmöller J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J hum Genet* 1995;57:581-592.
120. Vatsis KP, Martell KJ, Weber WW. Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6333-6337.
121. Blum M, Demierre A, Grant DM, Heim M, Meyer UA. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5237-5241.
122. Ebisawa T, Deguchi T. Structure and restriction fragment length polymorphism of genes for human liver arylamine N-acetyltransferases. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177:1252-1257.
123. Grant DM, Blum M, Demierre A, Meyer UA. Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. *Nucleic Acids Res* 1989;17:3978.
124. Hickman D, Sim E. N-Acetyltransferase polymorphism: Comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochem Pharmacol* 1992;42:1007-1014.
125. Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Hein DW. Cloning, expression, and functional characterization of two mutant (NAT2 191 and NAT2

- 341/803) and wild-type human polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) alleles. *Drug Metab Dispos* 1994;22:371-376.
126. Abe M, Deguchi T, Suzuki T. The structure and characteristics of a fourth allele of polymorphic N-acetyltransferase gene found in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Comm* 1993;191:811-816.
 127. Martinez C, Agundez JAG, Olivera M, Martin R, Ladero JM, Benitez J. Lung cancer and mutations at the polymorphic NAT2 gene locus. *Pharmacogenetics* 1995;5:207-214.
 128. Agundez JAG, Olivera M, Ladero JM, Lescure-Rodriguez, A Ledesma MC Diaz-Rubio M, Meyer UA, Benitez J. Increased risk for hepatocellular carcinoma in NAT2-slow acetylators and CYP2D6-rapid metabolizers. *Pharmacogenetics* 1996;6:501-512.
 129. Agundez JAG, Olivera M, Martinez C, Ladero JM, Benitez J. Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human NAT2 gene in a white population. *Pharmacogenetics* 1996;6:423-428.
 130. Leff MA, Fretland AJ, Doll MA, Hein DW. Novel human N-acetyltransferase 2 alleles that differ in mechanism for slow acetylator phenotype. *J Biol Chem* 1999;274:34519-34522.
 131. Woolhouse NM, Qureshi MM, Bayoumi RA. A new mutation C759T in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics* 1997;7:83-84.
 132. Anitha A, Banerjee M. Arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism in the ethnic populations of South India. *Int J Mol Med* 2003;11:125-131.

133. Doll MA, Zang Y, Yeager M, Welch R, Chanock S, Hein DW. Homo sapiens N-acetyltransferase (NAT2) gene, NAT2*5I allele, complete cds. GenBank 2003, AY23052.
134. Tanira MOM, Simsek M, Al Balushi K, Al Lawatia K, Al Barawani H, Bayoumi RA. Distribution of arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) genotypes among Omani Arabs. SQU Journal for Scientific Research: Medical Sciences 2003;5:9-14.
135. Dandara C, Masimirembwa CM, Magimba A, Kaaya S, Sayi J, Sommers DK, Snyman JR, Hasler JA. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotypes in Africans: the identification of a new allele with nucleotide changes 481C>T and 590G>A. Pharmacogenetics 2003;13:55-58.
136. Lee S-Y (Email: lsy117@hanmail.net) Kim J-W (Email: jwonk@smc.samsung.co.kr) personal communication.
137. Sekine A, Saito S, Lida A, Mitsunobu Y, Higuchi S, Harigae S Nakamura Y. Identification of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of human N-acetyltransferase genes NAT1, NAT2, AANAT, ARD1, and L1CAM in the Japanese population. J Hum Genet 2001;46:314-319.
138. Cascorbi I, Brockmoller J, Bauer S, Reum T, Roots I. NAT2*12A (803A-G) codes for rapid arylamine N-acetylation in humans. Pharmacogenetics 1996;6: 257-259.
139. Agundez JA, Martinez C, Olivera M, Ledesma MC, Ladero JM, Benitez J. Molecular analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in a Spanish population. Clin Pharmacol Ther 1994;56:202-209.
140. Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Brubaker LH, Kadlubar FF, Lucier GW. Genotype/phenotype discordance for human

- arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis* 1993;14:1689-1692.
141. Delomenie C, Sica L, Grant DM, Krishnamoorthy R, Dupret JM. Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2*) gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics* 1996;6:177-185.
142. Lin HJ, Han CHY, Lin BK, Hardy S. Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics* 1994;4:125-134.
143. Shishikura K, Hohjoh H, Tokunaga K. Novel allele containing 190C>T nonsynonymous substitution in the N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Hum Mut* 2000;15:581.
144. Lee SY, Lee KA, KI CS, Kwon OJ, Kim HJ, Chung MP, Suh GY, Kim J.W. Complete sequencing of a genetic polymorphism in NAT2 in the Korean population. *Clin Chem* 2002;48:775-777.
145. Zhu Y, Doll MA, Hein DW. Functional genomics of C190T single nucleotide polymorphism in human N-acetyltransferase 2. *Biol Chem* 2002;383:983-987.
146. Hein DW, Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD, Gray K. Molecular genetics of human polymorphic N-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15 recombinant human wild-type, mutant and chimeric NAT2 alloenzymes. *Hum Mol Genet* 1994;3:729-734.
147. Dupret JM, Goodfellow GH, Janezic SA, Grant DM. Structure-function studies of human arylamine N-acetyltransferase NAT1 and NAT2: functional analysis of NAT1/NAT2 protein chimeras expressed in *E. Coli*. *J Biol Chem*. 1994;269:26830-26835.

148. Hickman D, Palamanda JR, Unadkat JD, Sim E. Enzyme kinetic properties of human recombinant arylamine N-acetyltransferase 2 allotypic variants expressed in *Escherichia Coli*. *Biochem Pharmacol* 1995;50:697-703.
149. Delomenie C, Goodfellow GH, Krishnamoorthy R, Grant DM, Dupret JM. Study of the role of the highly conserved residues Arg⁹ and Arg⁶⁴ in the catalytic function of the human N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 by site-directed mutagenesis. *Biochem J* 1997;323:207-215.
150. Cascorbi I, Roots I. Pitfalls in N-acetyltransferase 2 genotyping. *Pharmacogenetics* 1999;9:123-127.
151. O'Neil WM, Drobitch RK, McArthur RD, Farrough MJ, Doll MA, Fretland AJ, Hein DW, Crane LR, Svensson CR. Acetylator phenotype and genotype in patients infected with HIV: discordance between methods for phenotype determination and genotype. *Pharmacogenetics* 2000;10:171-182.
152. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffeta P, Bouchardy C, Breskar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli F, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovis J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stüker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. Metabolic gene

- polymorphism in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1239-1248.
153. Hiratsuka M, Kishikawa Y, Takekuma Y, Matsuura M, Narahara K, Inoue T, Hsmdy SI, Endo N, Goto J, Mizugaki M. Genotyping of the N-acetyltransferase 2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients. *Drug Metabol Pharmacokin* 2002;17:357-362.
 154. Martinez C, Agundez JA, Olivera M, Ramirez R, Hernandez M, Benitez J. Influence of genetic admixture on polymorphisms of drug metabolizing enzymes: analyses of mutations on NAT2 and C gamma P2E1 genes in a mixed Hispanic population. *Clin Pharmacol Ther* 1998;63:623-628.
 155. Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, Branch RA, Brockmöler J, Ishizaki T, Karakaya AE, Laredo JM, Mommsen S, Okkels H, Rompes M, Roots I, Rothman N. Cigarette smoking, Nacetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of gene-enviroment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:461-467.
 156. García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardon A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castaño-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Tora M, Fernandez F, Real FX, Rothman N. NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes increase bladder cancer risk: results from the Spanish bladder cancer study and meta-analyses. *Lancet* 2005;20:649-659.

157. Ye Z, Parry JM. Meta-analysis of 20 case-control studies on the N-acetyltransferase 2 acetylation status and colorectal cancer risk. *Med Sci Monit* 2002;8:558-565.
158. Borlak J, Reamon-Buettner S. N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphisms in colon and lung cancer patients. *BMC Medical Genetics* 2006;7:58
159. Agundez JA, Lozano JM, Sastre J, Cerdan FJ, Diaz-Rubio M, Benitez J. N-acetyltransferase 2 (NAT2) genotype and colorectal carcinoma: risk variability according to tumour site? *Scand J Gastroenterol* 2000;10:1087-1091.
160. Morita S, Yano M, Tsujinaka T, Akiyama Y, Taniguchi M, Kaneko K, Miki H, Fujii T, Yoshino K, Kusuoba H, Monden M. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1999;80:685-688.
161. Ochs-Balcom HM, Wiesner G, Elston RC. Meta-analysis of the association of N-acetyltransferase 2 gene (NAT2) variants with breast cancer. *Am J Epidemiol* 2007;166:246-254.
162. Arif E, Vibhuti A, Alam P, Deepak D, Singh B, Athar M, Pasha MA. Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta* 2007;382:37-42.
163. Borlak J, Reamon-Buettner ST. N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in Parkinson's disease. *BMC Medical Genetics* 2006;7:30.
164. Pawlik A, Ostanek L, Brzosko I, Gawroska-Szklarz B, Brzosko M, Dabrowska-Zamojcin E. Increased genotype frequency of N-acetyltransferase 2 slow acetylation in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:319-325.

165. Woolsey RL, Drayer DE, Reidenberg MM, Nies AS, Carr K, Oates JA. Effect of acetylator phenotype on the rate at which procainamide induces antinuclear antibodies and the lupus syndrome. *New Engl J Med* 1978;298:1157-1159.
166. Chen B, Li JH, Xu YM, Wang J, Cao XM. The influence of NAT2 genotypes on the plasma concentration of isoniazid and acetylisoniazid in Chinese pulmonary tuberculosis patients. *Clin Chim Acta* 2006;365:104-108.
167. Hayes JD, Fanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.
168. Pearson WR, Vorachek WR, Xu S-J, Berger R, Hart I, Bañáis D, Patterson D. Identification of Class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet* 1993;53:220-233.
169. Boyer DT. The Glutathione S-transferases: an update. *Hepatology* 1989;9:486-496.
170. Bolt HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases *GSTT1* and *GSTM1* in pharmacology and toxicology. *Current Drug Metabolism* 2006;7:613-628.
171. Thier R, Brüning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, Bolt HM. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health* 2003;206:149-171.
172. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998;273:3517-3527.

173. Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 2005;221:123-129.
174. El-Masri HA, Bell DA, Portier CJ. Effects of glutathione transferase theta polymorphism on the risk estimates of dichloromethane to humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;158:221-230.
175. Shen J, Lin G, Yuan W, Tan J, Bolt HM, Their R. Glutathione S-transferase T1 and M1 genotype polymorphism in the normal population of Shanghai. *Arch Toxicol* 1998;72:456-458.
176. Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 1995;16:1243-1245.
177. Hallier E, Schöder KR, Asmuth K, Dommermuth A, Aust B, Goergens HW. Metabolism of dichloromethane (methylene chloride) to formaldehyde in human erythrocytes: influence of polymorphism of glutathione transferase theta (GSTT1-1). *Arch Toxicol* 1994;68:423-427.
178. Oke B, Akbas F, Aydin M, Berkkan H. GSTT1 null genotype frequency in a Turkish population. *Arch Toxicol* 1998;72:454-455.
179. Hallier E, Langhof T, Dannappel D, Leutbecher M, Schöder K, Goergens HW, Müller A, Bolt HM. Polymorphisms of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes. *Arch Toxicol* 1993;67:173-178.
180. Naveen AT, Adithan C, Padmaja N, Shashindran CH, Abraham BK, Satyanarynamoorthy K, Anitha P, Gerard N, Krishnamoorthy. Glutathione S-

- transferase M1 and T1 null genotype distribution in South Indians. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:403-406.
181. Fruehauf JP, Zonis S, al-Bassam M, Kyshtoobayeva A, Dasgupta C, Milovanovic T, Parker RJ, Buzaid AC. Melanin content and downregulation of glutathione S-transferase contribute to the action of L-buthione-S-sulfoximine on human melanoma. *Chem Biol Interact* 1998;111:277-305.
182. Jungnelius U, Ridderström M, Hanson J, Ringborg U, Mannervik B. Similar toxic effect of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurea on lymphocytes from human subjects differing in the expression of glutathione transferase M1. *Biochem Pharmacol* 1994;47:1777-1780.
183. Lien S, Larson AK, Mannervik B. The polymorphic glutathione transferase T1-1, the most efficient glutathione transferase in denitrosation and inactivation of anticancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurea. *Biochem Pharmacol* 2002;63:191-197.
184. Mukanganyama S, Widersten M, Naik YS, Mannervik B, Hasler JA. Inhibition of glutathione S-transferases by antimalarial drugs possible implications for circumventing anticancer drug resistance. *Inter J Cancer* 2002;97:700-705.
185. Simon T, Becquemont L, Mary-Krause M, De Waziers I, Beaune P, Funck-Brentano C, Jaillon P. Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and tacrine hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2000;67:432-437.
186. Watanabe I, Tomita A, Shimizu M, Sugawara M, Yamuso H, Koishi R. A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-

- associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. Clin Pharmacol Ther 2003;73:435-455.
187. Li R, Boerwinkle E, Olshan AF, Chambless LE, Pankow JS, Tyroler HA, Bray M, Pitman GS, Bell DA, Heiss G. Glutathione S-transferase genotype as a susceptibility factor in smoked related coronary heart disease. Atherosclerosis 2000;149:451-462.
188. Olshan AF, Li R, Pankow JS, Bray M, Tyroler HA, Chambless LE, Boerwinkle E, Pitman GS, Bell DA. Risk of atherosclerosis: interaction of smoking and glutathione S-transferase genes. Epidemiology 2003;14:321-327.
189. Doney AS, Lee S, Leese GP, Morris AD, Palmer CC. Increased cardiovascular morbidity and mortality in type 2 diabetes is associated with the glutathione S transferase theta-null genotype: a Go-DARTS study. Circulation 2005;111:2927-2934.
190. Miller EA, Pankow JS, Milikan RC, Bray MS, Ballantyne CM, Bell DA, Heiss G, Li R. Glutathione-S-transferase genotypes, smoking, and their association with markers of inflammation, hemostasis, and endothelial function: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Atherosclerosis 2003;171:265-272.
191. Joos L, Paré PD, Sandford AJ. Genetic risk factors for chronic obstructive disease. Swiss Med Wkly 2002;132:27-37.
192. Ugenskienė R, Sanak M, Sakalauskas R, Szczeklik A. Genetic polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. Medicine (Kaunas) 2005;41:17-21 (abstract).

193. Imboden M, Downs SH, Senn O, Matyas G, Brandy O, Russi EW, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Berger W, Probst-Hensch NM; SADALPIA Team. Glutathione S-transferase genotypes modify lung function decline in the general population: SAPALDIA cohort study. *Respir Res* 2007;8:2-19.
194. Hanene Ch, Jihene L, Jamel A, Kamel H, Agnes H. Association of GST genes polymorphisms with asthma in tunisian children. *Mediators Inflamm* 2007; Epub 2007 Mar 19.
195. Lee YL, Hsiue TR, Lee YCh, Lin YCh, Guo YL. The association between glutathione S-transferase P1, M1 polymorphisms and asthma in taiwanese school children. *Chest* 2005;128:1156-1162.
196. Mak JC, Ho SP, Leung HC, Cheung AH, Law BK, So LK, Chan CH, Lam WK, Ip MS, Chan-Yeung M. Relationship between glutathione S-transferase gene polymorphisms and the enzyme activity in Hong Kong chinese asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2007;37:1150-1157.
197. Brasch-Andersen C, Christiansen L, Tan O, Haagerup A, Vetsbo J, Kruse TA. Possible gene dosage effect of glutathione S-transferases on atopic asthma: using a real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers. *Hum Mutat* 2004;24:208-214.
198. Piirilä P, Wikman H, Luukkonen R, Kääriä K, Rosenberg c, Nordman H, Norppa H, Vainio H, Hirvonen A. Glutathione S-transferase genotypes and allergic responses to diisocyanate exposure. *Pharmacogenetics* 2001;11:437-445.
199. Gilliland FD, Li YF, Saxon A, Díaz-Sánchez D. Effect of glutathione S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic

- responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet* 2004;363:119-125.
200. Rodrigo I, Alvarez V, Rodríguez M, Pérez R, Alvarez R, Coto E. N-acetyltransferase-2, glutathione-S-transferase M1, alcohol dehydrogenase and cytochrome p450IIE1 genotypes in alcoholic liver cirrosis: a case-control study. *Scand J Gastronterol* 1999;34:303-307.
 201. Davies MH, Elias E, Acharya S, Cotton W, Faulder GC, Fryer AA, Strange RC. GSTM1 null polymorphism at the gultathione S-transferase M1 locus: phenotype and genotype studies in patients with primary biliary cirrhosis. *Gut* 1993;34:549-553.
 202. Kumagai S. ADF/Thioredoxin as an indicator of oxidative stress. *Rinsho Byori* 1998;46:574-580 (abstract).
 203. Von Schmiedeberg S, Fristche E, Ronnau Ac, Specker C, Golka K, Richter-Hintz D, Schuppe HC, Lehmann P, Ruzicka T, Esser C, Abel J, Gleichmann E. Polymorphisms of the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP1A1 and NAT-2 in systemic sclerosis and lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* 1999;455:147-152.
 204. Fraser PA, Ding WZ, Mohseni M, Treadwell EL, Dooley MA, St Clair EW, Gilkeson GS, Cooper GS. Glutathione S-transferase M null homozygosity and the risk of systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gen-enviroment interaction for autoimmunity. *J Rheumatol* 2003;30:276-282.
 205. Kang TY, El-Sohemy A, Comelis MC, Eny KM, Bae SC. Glutathione S transferase genotype and the risk of systemic lupus erythematosus in Koreans. *Lupus* 2005;14:381-384.

206. Matthey DL, Hassell AB, Plant M, Dawes PT, Ollier WR, Jones PW, Fryer AA, Aldersea JE, Strange RC. Association of polymorphism in glutathione S-transferase loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis: comparison with the shared epitope. *Ann Rheum Dis* 1999;164-168.
207. Matthey DL, Hutchinson D, Dawes Pt, Nixon NB, Clarke S, Fisher J, Brownfield A, Aldersea JE, Fryer AA, Strange RC. Smoking and disease severity in rheumatoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus. *Arthritis Rheum* 2002;46:640-646.
208. Ketterer B, Meyer DJ, Coles B, Taylor JB, Pemble S. Glutathione transferases and carcinogenesis. *Basic Life Sci* 1986;39:103-126.
209. Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutation Res* 2000;463:247-283.
210. Risch A, Wikman H, Thiel S, Schmezer P, Edler L, Drings P, Dienerman H, Kayser K, Schulz V, Spiegelhalder B, Bartsch H. Glutathione S-transferase M1, M3, T1 y P1 polymorphisms and susceptibility to non-small-cell lung cancer subtypes and hamartomas. *Pharmacogenetics* 2001;11:757-764.
211. Zhao B, Seow A, Lee EDJ, Poh WT, The M, Eng P, Wang Y-T, Tan W-C, Yu MC, Lee HP. Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase M1, T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1063-1067.
212. Ye Z, Song H, higgins JPT, Pharoah P, Danesh J. Five glutathione S-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *PLoS Med* 2006;3:524-534.
213. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ, Schwartz AG. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, enviromental tobacco smoke exposure and risk

of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis* 2005;26:395-401.

214. Brennan P, Boffetta P. Mechanistic considerations in the molecular epidemiology of head and neck cancer. *IARC Sci Publ* 2004;157:393-414.
215. Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:3-28.
216. Nair U, Bartsch H. Metabolic polymorphisms as susceptibility markers for lung and oral cavity cancer. *IARC Sci Publ* 2001;154:271-290.
217. Oude Ophuis MB, Van Lieshout EM, Roelofs HM, Peters WH, Manni JJ. Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer* 1998;82:936-943.
218. Geisler SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol* 2001;154:95-105.
219. Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisey R, Cascorbi L, Lazarus P, Oude Ophuis MB, Benhamou S, Foulkes WD, Katoh T, Coutelle C, Romkes M, Gaspari L, Taioli E, Boffetta P. Meta and pooled analysis of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genotypes and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1509-1517.
220. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckman D, Baldwin D, Pantin C, Wild N, Leopard P, Bell DA, Jones P, Duncan H, Brannigan K, Alldersea J, Fryer AA, Strange RC. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and

- susceptibility to cancer: studies of interaction with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996;17:881-884.
221. Smits KM, Gaspari L, Weijenberg MP, Dolzan V, Golka K, Roemer HC, Nedelcheva-Kristensen V, Lechner MC, Mehling GI, Seidegard J, Strange RC, Taioli E. Interaction between smoking and colorectal cancer: results from the GSEC study. *Biomarkers* 2003;8:299-310.
222. Ates NA, Tamer L, Ates C, Ercan B, Elipek T, Ocal K, Camdeviren H. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet* 2005;43:149-163.
223. Yu MW, Yang SY, Pan IJ, Lin CI, Liu CH, Liaw YF, Lin SM, Chen PJ, Lee SD, Chen CJ. Polymorphisms in XRCC1 and glutathione S-transferase genes and hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Natl Cancer Inst* 2003;95:1485-1488.
224. Deng ZL, Wei YP, Ma Y. Polymorphism of glutathione S-transferase mu and theta genes and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *World J Gastroenterol* 2005;11:272-274.
225. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 2005;352:2211-2221.
226. Ortiz de Montellano PR, De Voss JJ. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome p450. *Nat Prod Rep* 2002;19:477-93.
227. Quiñones L, Lee K, Varela FN, Escala M, García K, Godoy L, Castro A, Soto J, Saavedra I, Cáceres DD. Farmacogenética del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos. *Rev Méd Chile* 2006;134:499-515.

228. Solus JF, Arietta BJ, Harris JR, Sexton DP, Steward JQ, McMunn Ch, Ihrie P, Mehall JM, Edwards TL, Dawson EP. Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics* 2004;5:895-931.
229. Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Human ethanol-inducible P450IIE1: complete sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* 1988;13:9006-9013.
230. Watanabe J, Hayashi S, Nakachi K, Imai K, suda Y, Sekine T, Kawajiri K. PstI and RsaI RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E1 gene. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7194.
231. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem* 1991;110:559-565.
232. Persson I, Johansson I, Bergling H, Dahl ML, Seidegard J, Rylander R, Rannug A, Högberg J, Sundberg MI. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett* 1993;319:207-211.
233. McBride OW, Umeno M, Gelboin HV, Gonzalez FJ. A TaqI polymorphism in the human P450IIE1 gene on chromosome 10 (CYP2E1). *Nucleic Acids Res* 1987;15:10071.
234. BrockmöllerJ, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherit polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome

- P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 1996;56:3915-3925.
235. Hu Y, Hakkola J, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M. Structural and functional characterization of 5'-flanking region of the rat and human cytochrome P450 2E1 genes: identification of polymorphic repeat in the human gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:286-293.
 236. McCarver DG, Byun R, Hines RN, Hichme M, Wegenek W. A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1: association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and the ethanol intake. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;152:276-281.
 237. Hu Y, Oscarson M, Johanson I, Yue QY, Dahl ML, Tabone M, Arincò S, Albano E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles. *Mol Pharmacol* 1997;51:370-376.
 238. Fairbrother KS, Grove J, de Waziers I, Steimel DT, Day CP, Crespi CL, Daly AK. Detection and characterization of novel polymorphisms in the CYP2E1 gene. *Pharmacogenetics* 1998;8:543-552.
 239. Wang SL, Lee H, Chen KW, Tsai KJ, Chen CY, Lin P. Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer* 1999;26:27-34.
 240. Stephens EA, Taylor JA, Kaplan n, Yang CH, Hsieh LL, Lucier GW, Bell Da. Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 1994;4:185-192.

241. Rossini A, Lima SS, Rapozo DC, Faria M, Albano RM, Pinto LF. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:195-201.
242. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 2000;1:1-9.
243. Blake MJ, Abdel-Rahman SM, Pearce RE, Leeder JS, Kearns GL. Effect of diet on the development of drug metabolism by cytochrome P-450 enzymes in healthy infants. *Pediatr Res* 2006;60:717-723.
244. Ioannides C. Effect of diet and nutrition on the expression of cytochromes P450. *Xenobiotica* 1999;29:109-154.
245. Eliasson E, Gardner I, Hume-Smith H, de Waziers I, Beaune P, Kenna JG. Interindividual variability in P450-dependent generation of neoantigens in halothane hepatitis. *Chem Biol Interact* 1998;116:123-141.
246. Lee SS, Buters JT, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J Biol Chem* 1996;271:12063-12067.
247. Gemma S, Vichi S, Testai E. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. *Ann Ist Super Sanita* 2006;42:8-16.
248. Asai H, Imaoka S, Kuroki T, Monna T, Funae Y. Microsomal ethanol oxidizing system by human hepatic cytochrome P450s. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:1004-1009.
249. Park KS, Sohn DH, Veech RL, Song BJ. Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *Eur J Pharmacol* 1993;248:7-14.

250. Ross AD, Varghese G, Oporto B, Carmichael FJ, Israel Y. Effect of propyltiuracil treatment on NADPH-cytochrome P450 reductase levels, oxygen consumption and hydroxyl radical formation in liver microsomes from rats fed ethanol or acetone chronically. *Biochem Pharmacol* 1995;49:979-989.
251. Hu Y, Mishin V, Johanson I, von Bahr C, Cross A, Ronis MJ, Badger TM, Ingelman-Sundberg M. Chlormetiazole as an efficient inhibitor of cytochrome P450 2E1 expression in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269:1286-1291.
252. Jaya DS, Augustine J, Menon VP. Role of lipid peroxides, glutathione and antiperoxidative enzymes in alcohol and drug toxicity. *Indian J Exp Biol* 1993;31:453-459.
253. Agarwal DP. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol Biol (Paris)* 2001;49:703-709.
254. Watanabe J, Hayashi S, Kawajiri K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *J Biochem* 1994;116:321-326.
255. Lucas D, Ménez C, Girre C, Berthou F, Bodéñez P, Joannet I, Hisprad E, Bardou LG, Ménez JF. Cytochrome P450 2E1 genotype and the chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* 1995;5:298-304.
256. Powell H, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Smith DA, Park BK. Expression of cytochrome P4502E1 in human liver: assessment by mRNA, genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 1998;8:411-421.

257. Lin JH, Lu AY. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:535-567.
258. Siborova M, Frei E, Hodek P, Wiessler M, Schemeiser HH. Human hepatic and renal microsomes, cytochromes P4501A1/2, NADPH:cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthetase mediate the formation of aristolochic acid-DNA adducts found in patients with urothelial cancer. *Int J Cancer* 2005;113:189-197.
259. Bachmann KA. The cytochrome P450 enzymes of hepatic drug metabolism: how are their activities assessed in vivo and what is their clinical relevance? *Am J Ther* 1996;3:150-171.
260. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* 2004;39:155-165.
261. Iwashashi K, Suwaki H. Ethanol metabolism, toxicity and genetic polymorphism. *Addiction Biol* 1998;3:249-259.
262. Grove J, Brown AS, Daly AK, Bassendine MF, James OF, Day CP. The RsaI polymorphism of CYP2E1 and susceptibility to alcoholic liver disease in Caucasians: effect on age of presentation and dependence on alcohol dehydrogenase genotype. *Pharmacogenetics* 1998;8:335-342.
263. Wong NA, Rae F, Simpson KJ, Murray GD, Harrison DJ. Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis. *Mol Pathol* 2000;53:88-93.
264. Arif E, Vibhuti A, Alam P, Deepak D, Singh B, Athar M, Pasha MA. Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta* 2007;382:37-42.

265. Quiñones L, Lucas D, Godoy J, Cáceres D, Berthou F, Varela N, Lee K, Acevedo C, Martínez L, Aguilera AM, Gil L. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Lett* 2001;174:35-44.
266. Yang J, Qian LX, Wu HF, Xu ZQ, Sui YG, Wang XR, Zhang W. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 1A1 and 2E1 genes, smoking, drinking and prostate cancer susceptibility: a case-control study in a Han nationality population in Southern China. *Int J Urol* 2006;13:773-780.
267. Wu MS, Chen CJ, Lin MT, Wang HP, Shun CT, Sheu JC, Lin JT. Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to gastric carcinoma in Taiwan. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:338-343.
268. Watanabe J, Yang JP, Eguchi H, Hayashi S, Imai K, Nakachi K, Kawajiri K. An Rsa I polymorphism in the CYP2E1 gene does not affect lung cancer risk in a Japanese population. *Jpn J Cancer Res* 1995;86:245-248.
269. Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Sugimura H, Trivers GE, Tucker MA, Trump BF, Weston A, Harris CC. Analysis of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:515-518.
270. Hamada GS, Sugimura H, Suzuki I, Nagura K, Kiyokawa E, Iwase T, Tanaka M, Takahashi T, Watanabe S, Kino I, Tsugane S. The heme-binding region polymorphism of cytochrome P450IA1 (CypIA1), rather than the RsaI polymorphism of IIE1 (CypIIE1), is associated with lung cancer in Rio de Janeiro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:63-67.

271. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H. The human CYP2E1 gene and lung cancer: DraI and RsaI restriction fragment length polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis* 1993;14:85-88.
272. Wang J, Deng Y, Li L, Kuriki K, Ding J, Pan X, Zhuge X, Jiang J, Luo C, Lin P, Tokudome S. Association of GSTM1, CYP1A1 and CYP2E1 genetic polymorphisms with susceptibility to lung adenocarcinoma: a case-control study in Chinese population. *Cancer Sci* 2003; 94:448-452.
273. Roy PD, Majumder M, Roy B. Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. *Pharmacogenomics* 2008;8:311-321.
274. Lazcano-Ponce E, Salazar-Martínez E, Hernández-Ávila M. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Publica Mex* 2001;43:135-150.
275. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 2005;366:941-951.

VIII. Addenda

VII. ADDENDA.

Datos parciales de este estudio han sido publicados en la revista *Liver International* (2008) y enviados a la revista *Pharmacogenomics* (2008).

Referencia bibliográfica:

-V Leiro, A Fernández-Villar, D Valverde, L Constenla, R Vázquez, A González-Quintela, L Piñeiro. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations in the risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Caucasian population. ***Liver International* 2008;6:835-839.**

Así mismo datos parciales de este trabajo han sido presentados en varios congresos de ámbito autonómico, nacional e internacional tanto de Neumología como de Genética y Farmacogenética.

Dicho proyecto ha recibido financiación por parte de las siguientes entidades:

- Sociedade Galega de Patoloxía Respiratoria y Cirurxía Torácica (SOGAPAR) (Beca Almirall 2004).
- Convocatoria conjunta de las consellerías de Innovación, Industria e Comercio e de Sanidade (axuda PGIDIT05SAN21PR).
- Fondos de Investigación Sanitaria (FIS) (Beca FIS PI052461).
- Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) (Beca SEPAR 2005 modalidad becario).

